

Aus dem Zentrum für Diagnostische Radiologie

Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. K. J. Klose

Abteilung für Strahlendiagnostik

Direktor: Prof. Dr. K. J. Klose

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

**Lokale Pharmakotherapie
mit NF- κ B „decoy“-Oligonukleotiden
zur Prophylaxe der Restenose
nach PTA**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Kerstin Krogmeier

aus Waiblingen

Marburg/Lahn 2006

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin am 19.01.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: PD Dr. Heiko Alfke

Korreferent: Prof. Dr. Dr. J. Daut

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Aufbau einer Arterie	9
1.2	Pathogenese der Atherosklerose	10
1.3	Pathomechanismus der Restenose.....	14
1.3.1	Definition der Restenose	14
1.3.2	Elastic recoil, Thrombusbildung, Inflammation	15
1.3.3	Intimahyperplasie	17
1.3.4	Remodeling	19
1.4	Therapieansätze.....	20
1.4.1	Konventionelle systemische Pharmakotherapie.....	20
1.4.2	Stents	21
1.4.3	Gentherapeutische Ansätze	22
1.5	NF- κ B-/I- κ B- Familie	25
1.5.1	Der Aufbau von NF- κ B.....	25
1.5.2	Der Aufbau von I- κ B	26
1.5.3	Die Aktivierung von NF- κ B	26
1.5.4	Die Bedeutung von NF- κ B im Rahmen der Restenose	28
1.6	Lokale Pharmakotherapie	29
1.7	Kathetersysteme zur lokalen Pharmakotherapie	32
1.8	Fragestellung	35
2.	Material und Methoden	37
2.1	Versuchstiere.....	37
2.2	Oligonukleotide.....	38
2.3	Medikamente	39
2.4	Kathetermaterial	40
2.5	Vorversuche	41
2.5.1	In vitro-Vorversuche	41
2.5.2	Auswertung der <i>in vitro</i> -Versuche	41
2.5.3	<i>Ex vivo</i> -Versuche	42
2.6	Hauptversuche.....	42
2.6.1	Intervention 1 – Intimadenudation	42
2.6.2	Intervention 2 – Lokale Applikation von NF- κ B.....	43
2.6.3	Intervention 3 – Gefäßentnahme	44
2.7	Gefäßpräparate	45
2.7.1	Einbettung und Schneiden	45
2.7.2	Färbung	45
2.7.3	Morphometrische Auswertung	46
2.8	Statistische Auswertung	47
3.	Ergebnisse	48
3.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	48
3.2	Versuchstiere.....	50
3.3	Angiographische Auswertung.....	51
3.4	Morphometrische Daten.....	54
3.4.1	Fläche des Lumens	54

3.4.2	Neointimafläche	55
3.4.3	Intima/Media-Verhältnis	56
3.5	Bilder	58
4.	Diskussion	59
4.1	Zellkulturen, Tiermodelle und klinische Studien	59
4.2	Gentherapie zur Prophylaxe der Restenose	64
4.2.1	Betrachtung von NF- κ B	68
4.2.2	Vektoren	71
4.3	Diskussion der lokalen Pharmakotherapie	76
4.3.1	Einfluss der Applikationsparameter	77
4.3.2	Beurteilung des channeled-balloon Katheters	78
4.4	Schlussfolgerung	81
5.	Zusammenfassung	82
6.	Literaturverzeichnis	84
7.	Danksagung	101

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
FGF	Fibroblast growth factor
ICAM	Intercellular adhesion molecules
I- κ B	Inhibitor des kappa B
IKK	I- κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
LDL	Low density lipoproteins
LEE	Lamina elastica externa
LEI	Lamina elastica interna
MCP	Monocytes chemotactic protein
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	Nuclear-factor kappa B
ODN	Oligodesoxynukleotide
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	Platelet derived growth factor
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
SMC	Smooth muscle cells; glatte Muskelzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM	Vascular-cell adhesion molecules
VSMC	Vascular smooth muscle cells; vaskuläre glatte Muskelzellen

1. Einleitung

Im Jahr 2000 ist laut einer Erhebung des Statistischen Bundesamts jeder Zweite in der Bundesrepublik Deutschland infolge von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems gestorben (132). Die Volkskrankheit Atherosklerose ist eine der Hauptursachen für diese Krankheiten. Sie manifestiert sich an den arteriellen Gefäßen und führt hier zu Stenosen und Verschlüssen. Dadurch wird die Durchblutung der Organe und deren Versorgung mit Sauerstoff und wichtigen Stoffwechselprodukten limitiert. Es kommt zu Ischämien, die sich klinisch z.B. in Form der Koronarinsuffizienz, des Schlaganfalles oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit manifestieren (22).

Die arteriellen Gefäßstenosen können unterschiedlich therapiert werden. Bei der chirurgischen Therapie werden synthetische, venöse oder arterielle Bypässe implantiert, und/oder das Verschlussmaterial wird wie bei der Thrombendarteriektomie operativ entfernt. Viel häufiger wird jedoch ein nichtoperativer Therapieansatz zur Revaskularisierung von Gefäßstenosen gewählt. Hier stellt die im Jahr 1964 durch Charles Dotter eingeführte perkutane transluminale (Koronar-) Angioplastie (PTCA bzw. PTA) das heutige Standardverfahren dar (30). Der Angioplastieballon wurde im Jahr 1977 durch Andreas Grüntzig entwickelt. 1999 wurden in Deutschland allein über 150.000 PTCA durchgeführt (19).

Die primäre Erfolgsrate der Ballonangioplastie ist sehr hoch und liegt bei 90-100%. Auch konnte die Rate der akuten schweren Komplikationen dieser Verfahren auf etwa 1%, die der letalen Komplikationen auf unter 1% gesenkt werden. Den limitierenden Faktor stellt jedoch die Restenoserate dar, die sechs Monate nach einer Ballonangioplastie bei 30-50% liegt (18, 62).

Dieser hohen Restenoserate liegen viele Ursachen zugrunde. Ein zu geringes Verständnis der komplexen Vorgänge des Restenosemechanismus und ungeeignete Tiermodelle können nur zwei mögliche Erklärungen sein. Darüber hinaus gibt es keine einheitliche Definition der Restenose, was die Angaben der Restenoseraten nach PTA teilweise weit voneinander abweichen lassen (18, 43, 87, 112, 147).

Um dem Dilemma der Restenose zu entgehen, sind viele Studien durchgeführt worden. Alternative Verfahren wie Hochfrequenzangioplastie, Atherektomie und Laserangioplastie haben keine zufriedenstellenden Ergebnisse erbracht.

Auch pharmakotherapeutisch war man bislang mit dem Einsatz von gerinnungs- oder proliferationshemmende Substanzen wenig erfolgreich (33, 84, 96).

Lediglich neuere Studien mit intraluminalen Stents, die das Immunsuppressivum Sirolimus freisetzen, konnten die Restenoserate senken. Langzeitergebnisse stehen jedoch noch aus (129).

Die Gentherapie hat in den letzten Jahren zunehmend an Interesse gewonnen und auch schon vielversprechenden Erfolge erzielt. Sowohl die Verwendung von antisense- als auch von decoy- Oligonukleotiden (ODN) konnte eine Reduktion der Intimahyperplasie im Tierversuch erzielen (92, 100, 101, 127). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist dabei ein beliebter Angriffspunkt der Gentherapie. NF- κ B wird insbesondere bei Immun- und Entzündungsreaktionen vermehrt exprimiert und spielt auch eine wichtige Rolle bei der durch die Ballonangioplastie induzierten inflammatorischen Reaktion. Es wurde bislang unter anderem versucht, die Expression von NF- κ B durch die Einschleusung seines Inhibitors I κ B oder durch die Verwendung von antisense-ODN gegen die Untereinheiten zu hemmen (5, 20, 21, 142).

In unserer tierexperimentellen Studie, die dieser Arbeit zugrunde liegt, wurde unter Verwendung eines „channelled-balloon“ Katheters die Auswirkung von lokal applizierten decoy-Oligodesoxynukleotiden auf die Restenose untersucht.

1.1 Aufbau einer Arterie

Um die Pathophysiologie der Restenose, welche sich an den Blutgefäßen abspielt, zu verstehen, ist es wichtig, sich den Aufbau der Gefäße zu vergegenwärtigen. Im folgenden soll der Bauplan der Arterien erläutert werden.

Alle Blutgefäße haben einen gemeinsamen Grundbauplan (120):

- Tunica intima (Intima)
- Tunica media (Media)
- Tunica adventitia (Adventitia).

Je nach Anforderung an das einzelne Gefäß, wird dieser Bauplan in den unterschiedlichen Gefäßabschnitten modifiziert. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Gefäßen handelt es sich um Arterien des muskulären Typs, welche den dreischichtigen Aufbau am deutlichsten zeigen.

Die Intima setzt sich aus einschichtigem Endothel, einer darunter liegenden Basalmembran und dem subendothelialen Bindegewebe zusammen. Ihre Funktion besteht in der Kontrolle des Gas- und Stoffaustausches zwischen dem Blut und der Gefäßwand. Das Endothel ist darüber hinaus in der Lage, humorale Faktoren zu sezernieren. Die Intima wird durch die Membrana elastica interna, einer stark vernetzten elastischen Struktur, von der Media abgegrenzt.

Die Media besteht aus Kollagenfasern, elastischen Fasern und aus den für diesen Arterientyp charakteristischen vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC = vascular smooth muscle cells). Die Media kann durch Muskelkontraktion die Gefäßweite regulieren. Durch elastische Substanzen kann sie zudem die durch Blutdruck und Pulswelle verursachte Spannung aufnehmen. Die Grenze zur Adventitia hin wird durch die Membrana elastica externa gebildet. Diese ist meist nur schwach ausgebildet.

Die Adventitia wird von einem Geflecht aus Kollagenfasern und elastischen Fasern gebildet. Sie verankert das Gefäß in der Umgebung. Die Versorgung der Gefäßwand erfolgt über Diffusion aus dem Lumen, bei größeren Gefäßen

zusätzlich durch die sogenannten Vasa vasorum, welche von der Adventitia kommend ins äußere Drittel der Media eindringen. Die Innervation der Gefäßmuskulatur geschieht durch Fasern des vegetativen Nervensystems (120).

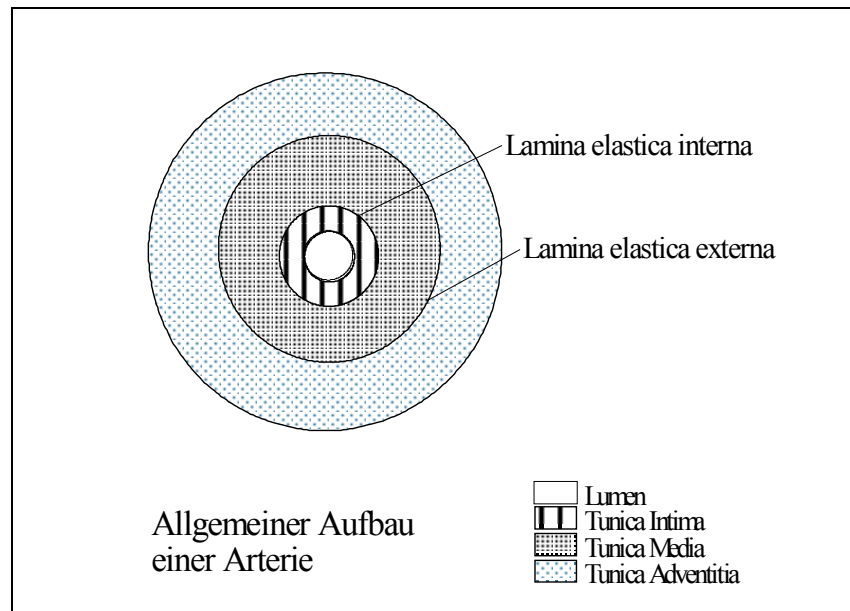


Abb. 1: Der Bauplan einer Arterie

1.2 Pathogenese der Atherosklerose

Die Hauptursache vieler kardiovaskulärer Krankheiten ist die Atherosklerose. Die Atherosklerose führt zu Gefäßstenosen oder -verschlüssen, die abhängig vom Grad der Stenose zu Behinderungen des Blutflusses führen können und Ischämien in den abhängigen Regionen bewirken. Die Folgen dessen sind unter anderem die Angina pectoris, der Myokardinfarkt und periphere arterielle Durchblutungsstörungen. In Abhängigkeit vom Stadium dieser Erkrankungen stellt sich die Indikation zur transluminalen Angioplastie (22).

Wegen der besonderen Bedeutung der Atherosklerose soll nun anhand von Modellen die Pathogenese der Atherosklerose beschrieben werden. Es ist wichtig, die Beschaffenheit eines atherosklerotisch veränderten Gefäßes zu kennen, um dessen Reaktion auf das durch die PTA induzierte Gefäßtrauma zu verstehen.

Erstmals wurden im Jahr 1852 von Rokitanski und im Jahr 1856 von Virchow Hypothesen zur Pathogenese der Atherosklerose postuliert (77).

Ross entwickelte 1986 ein komplexeres Modell der Atherosklerose (116), gefolgt 1989 bzw. 1990 von den Theorien von Stary und von Ip et al. (67). Auf die Modelle von Ross, Stary und Ip soll nun genauer eingegangen werden.

Ross beschreibt in seinem Response-to-injury Modell die Atherosklerose als eine inflammatorische Erkrankung. Der Pathomechanismus der Atherosklerose verläuft in mehreren Stufen:

1. Endotheldysfunktion mit erhöhter Endothelpermeabilität, Leukozytenmigration, Endotheladhäsion und Leukozytenadhäsion.
2. Ausbildung von „Fatty streaks“ durch T-Zell-Aktivierung, Plättchenadhäsion und –aggregation, Leukozytendiapedese, Schaumzellbildung und Migration glatter Muskelzellen (SMC; smooth muscle cells).
3. Ausbildung einer fibrösen Kappe durch Makrophagenakkumulation unter Bildung eines nekrotischen Kerns (116, 117).

Der Auslöser der Atherosklerose ist die Endotheldysfunktion. Einige mögliche Faktoren, die zur Dysfunktion führen sind unter anderem die arterielle Hypertonie, durch Zigarettenkonsum gebildete freie Radikale, der Diabetes mellitus, ein hohes Plasma-Homocystein, die Hypercholesterinämie, genetische Faktoren, infektiöse Mikroorganismen wie Herpesviren und Chlamydia pneumoniae und Scherkräfte, wie sie an Bifurkationen und Gefäßabgängen auftreten. Ein erhöhtes LDL ist dabei wohl der Hauptauslöser der Schädigung des Endothels und der darunter liegenden glatten Muskelzellen (81, 116, 117).

Das Endothel reagiert auf diese Einflüsse mit der Bildung spezifischer Adhäsionsmoleküle wie den E-Selektinen, den P-Selektinen, den Intercellular adhesion molecules-1 (ICAM) und den Vascular-cell adhesion molecules-1 (VCAM) auf der Endotheloberfläche. Diese Adhäsionsmoleküle dienen als Rezeptoren für das Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül 1, das L-Selektin und die Integrine, welche von den T-Zellen und den Monozyten präsentiert werden. Aktivierte T-Zellen und die Monozyten rollen am Endothel entlang, suchen es nach Rezeptoren ab und treten mit den Rezeptoren in Wechselwirkung. Es kommt zu einer Interaktion zwischen dem Rezeptor und seinem Liganden.

Chemotaktisch wirkende Zytokine (=Chemokine) – Monozyte chemotactic protein-1 (MCP-1), Macrophage colony-stimulating factor, Platelet-derived growth factor (PDGF), Osteopontin - werden von den Endothelzellen, den VSMC und den Monozyten sezerniert. Die Folge ist die Chemotaxis und die weitere Rekrutierung von Leukozyten. Die Monozyten und die T-Zellen werden durch $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin-2 und den Granulozyten-Makrophagen colony-stimulating factor aktiviert. Es kommt zur weiteren Hochregulation ihrer Oberflächenrezeptoren.

Durch die gesteigerte Permeabilität des Endothels können die Monozyten und die T-Zellen in das subendotheliale Gewebe einwandern. Es bilden sich sogenannte „fatty streaks“ bestehend aus lipidbeladenen Monozyten, T-Lymphozyten und Schaumzellen. Bei den Schaumzellen handelt es sich um ehemalige Makrophagen, die mit Hilfe von sogenannten scavenger- Rezeptoren an ihrer Oberfläche in der Lage sind, das in der Arterienwand akkumulierte und oxidierte LDL aufzunehmen und zu speichern (54). Die Internalisierung führt zur Bildung von Lipidperoxiden, welche die Anreicherung von Cholesterinestern erleichtern. Werden die Zellen mit Cholesterinestern überladen, wandeln sie sich in Schaumzellen um. Sie verlieren dabei die Fähigkeit zur Migration und bleiben ortständig. (38, 112, 116, 133, 137).

TGF- β , Fibroblast growth factor 2 (FGF 2) und PDGF stimulieren die Migration von VSMC zum Ort der Entzündung. Dort proliferieren die VSMC und synthetisieren die extrazelluläre Matrix. Daraus resultiert eine Gefäßwandverdickung, welche jedoch durch die gleichzeitige Gefäßdilatation neutralisiert wird und somit zunächst keine Veränderung im Gefäßdurchmesser bewirkt (46).

Wird der pathogene Reiz nicht beseitigt oder neutralisiert, bekommt die ursprünglich protektive Entzündungsreaktion einen destruktiven Charakter. Die weitere Vermehrung von Monozyten in der Läsion wird durch Makrophagen colony-stimulating factor und Granulozyten-Makrophagen colony-stimulating factor aufrechterhalten, die Vermehrung der Lymphozyten durch Interleukin-2. Die aktivierten Makrophagen produzieren unter anderem Zytokine ($\text{TNF-}\alpha$, Interleukin-1, TGF- β), PDGF, Insulin-like growth factor und Metalloproteinasen. Die aktivierten T-Lymphozyten sind in der Lage, Interferon- γ und $\text{TNF-}\alpha$ und - β zu synthetisieren (41, 42, 112, 116).

Eine weitere Einteilung der strukturellen Veränderungen im Verlauf der Entwicklung der Atherosklerose hat Stary vorgenommen. Er unterscheidet vier Läsionstypen:

- Stary I: Anwesenheit von Makrophagen und Schaumzellen in der Intima
- Stary II: zusätzlich lipidbeladene SMC und minimale extrazelluläre Lipidanhäufungen
- Stary III: multiple extrazelluläre Lipidkerne
- Stary IV: Atherom (131).

Ip et al. differenzieren drei Typen von Gefäßschäden, welche zur Pathogenese der Atherosklerose beitragen:

- Typ I - Läsionen: Funktionellen Veränderung von Endothelzellen ohne morphologische Veränderungen
- Typ II - Läsionen: Endotheldenudation mit Intimaschaden bei intakter Lamina elastica interna und
- Typ III – Läsionen: Endotheldenudation mit Intima- und Mediaschaden (67).

Die Typ I – Läsion ist die Folge chronischer, minimaler Einwirkungen auf die Gefäßwand, wie sie in Form von Scherkräften auftreten. Es werden vor allem Makrophagen und Lipide angereichert.

Durch die Freisetzung toxischer Substanzen aus den Makrophagen entsteht die Typ II – Läsion. Hier kommt es zudem zur Plättchenadhäsion an dem subintimalen Gewebe. Durch das Zusammenspiel von Makrophagen, Plättchen und Endothelzellen kommt es zur Sekretion von Wachstumsfaktoren und in Folge zur Migration von VSMC aus der Media in die Intima. Aus den kontraktilen, ruhenden VSMC entstehen proliferierende und extrazelluläre Matrix sezernierende VSMC (67, 112, 116). Zumeist bildet sich eine fibrointimale Läsion oder eine abgekapselte Lipidläsion. Rupturiert eine Lipidläsion, kommt es zur Typ III – Läsion mit Thrombusbildung und Gefäßokklusion.

Die oben genannten Veränderungen brauchen Jahrzehnte, um sich auszubilden. Im Gegensatz dazu entwickelt sich die Restenose über einen kurzen Zeitraum von drei bis sechs Monaten nach Ballonangioplastie (86, 112).

1.3 Pathomechanismus der Restenose

1.3.1 Definition der Restenose

Gefäßverletzungen, wie sie durch PTA verursacht werden, induzieren einen komplexen Heilungsprozess. Dieser Prozess ähnelt den Vorgängen der normalen Wundheilung und kann bei überschießender Heilung zur Restenose des Gefäßes führen (35). Bei der Restenose handelt es sich um einen pathophysiologischen Prozess, der innerhalb eines Zeitraums von etwa 6 Monaten seinen Höhepunkt erreicht. (81, 144). Restenose und Atherosklerose zeigen Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer pathophysiologischen Mechanismen. Bei beiden Prozessen spielen die vaskuläre Inflammation und die Leukozyten eine zentrale Rolle (144).

Es existieren mindestens 13 verschiedene Definitionen der Restenose (62, 112). Da unterschiedliche Forschungsgruppen unterschiedliche Definitionen ihren Auswertungen zugrunde legen, gibt es viele verschiedene, uneinheitliche Angaben über die Restenoseraten nach PTA bzw. PTCA (28, 112). Allgemein kann man die Restenose als eine Verringerung des Gefäßlumens an der Stelle der Angioplastie bezeichnen (28). Man differenziert klinische von histologischer und angiographischer Restenose. Bei der klinischen Restenose kommt es zu einem Wiederauftreten von klinischen Symptomen der Ischämie nach erfolgreicher PTA. Im Gegensatz dazu steht die histologische Restenose. Diese bezeichnet den histologischen Nachweis einer Neointima oder die Lumeneinengung durch Remodeling. Die für die Histologie notwendigen Präparate sind nur durch invasive Techniken oder postmortal zu bekommen. Per definitionem hätte hierbei fast jeder Patient eine Restenose, denn bei fast allen Patienten tritt zumindest zu einem gewissen Grad eine Neointima-Hyperplasie oder eine Lumenverengung auf, die jedoch zunächst klinisch ohne Bedeutung bleibt. Angiographisch kann die Restenose durch quantitative Meßmethoden definiert werden. Hier ist die Restenose zum Beispiel als 50%ige Stenose im vormals angioplastierten Segment definiert.

Je nach angewandter Methode kommt man somit zu einem unterschiedlich hohen Prozentsatz der Restenose (28).

Die Restenose verläuft über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten nach erfolgter PTA in mehreren Phasen. Die dabei ablaufenden Pathomechanismen verteilen sich auf folgende Stadien:

1. Elastic recoil
2. Thrombusbildung
3. Inflammation
4. Intimahyperplasie
5. Remodeling (18, 35, 68, 90, 144).

1.3.2 Elastic recoil, Thrombusbildung, Inflammation

Die Ballonangioplastie vergrößert zunächst das Gefäßlumen durch Dehnung der elastischen Gefäßbestandteile. Der Plaque als unelastischer Bestandteil reißt ein und wird in die Gefäßwand gepresst (35). Dabei kommt es zu Verletzungen der Gefäßwand und zur Endotheldenudation. Histologische Präparate vom ersten bis zum fünften Tag nach PTA zeigen Intimaeinrisse und Dissektionen bis in die Adventitia hinein (147). Induziert durch die Endotheldenudation während der Ballondilatation werden lokal Vasokonstriktoren und Plättchen-Aggregatoren wie Thromboxan A₂, ADP, Prostacyclin, Prostaglandin I₂ und Endothelin ausgeschüttet, welche zur Vasokonstriktion und zu lokalen Thrombozytenauflagerungen führen. Es kommt zudem noch in einigen Fällen zu subintimalen Einblutungen in den Plaque. Diese Abläufe können in den ersten 24 Stunden zum akuten Verschluss des Gefäßes führen. Dies geschieht bei etwa 5% der Patienten (1). Ein weiterer Faktor, der zum abrupten Verschluss innerhalb dieser Zeitspanne beiträgt, ist der „early elastic recoil“- ein Zusammenziehen der Gefäßwand, das den Durchmesser des Gefäßes um 50% reduzieren kann (28). Ausgelöst wird dies sowohl durch die Retraktion der durch die PTA überdehnten elastischen Bestandteile der Gefäßwand, insbesondere im Bereich der nicht atherosklerotisch vorgeschädigten Wand, als auch durch eine aktive, muskuläre Gefäßwandkontraktion.

Bei der Ballondilatation kommt es neben der Endotheldenudation auch zu Intima- und Mediaverletzungen. Die subendotheliale Matrix wird freigelegt und Thrombozyten können sich an der geschädigten Gefäßwand anheften und aggregieren (35).

Sie sezernieren den Inhalt ihrer α -Granula (PDGF, Plasmaproteine wie Fibrinogen; Thrombozyten-spezifische Proteine; Thromboxan A₂; Serotonin, von Willebrand-Faktor, ADP und andere), welche vasoaktive, prokoagulatorische und mitogene Wirkung haben. Durch die Endotheldenudation verliert das Gefäß eine wichtige Quelle antithrombotisch wirkender Faktoren (EDRF = endothelium-derived relaxing factor, Prostaglandin I₂, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, t-PA = tissue-Plasminogen-Aktivator). Innerhalb weniger Minuten bildet sich ein intramuraler Thrombus.

In den darauffolgenden Tagen findet eine Entzündungsreaktion statt, die vor allem durch die Präsenz und Aktivität von Makrophagen/Monozyten und T-Lymphozyten gekennzeichnet ist (35). Durch die Exposition von im Plaque befindlichen, ruhenden Makrophagen und Schaumzellen zu Mediatoren der Blutgerinnung und nicht zuletzt auch durch das Gefäßtrauma bedingt, werden diese aktiviert (38, 112, 116, 133). Die Genexpression für Zytokine und Wachstumsfaktoren wird hochreguliert. Die Makrophagen sezernieren unter anderem Interleukin-1 und -6, TNF- α , PDGF, FGF und TGF, welche Mitogene für die VSMC sind (66, 87, 91). Die VSMC befinden sich normalerweise in ruhender, kontraktile Form in der Gefäßwand. Durch diese Faktoren werden die VSMC aktiviert und wandeln sich phänotypisch um in mobile, kollagen-synthetisierende Zellen (13, 23, 35, 53, 90, 108). Einerseits werden also die ruhenden VSMC zur Proliferation und Kollagensynthese stimuliert, andererseits erfolgt durch diese Zytokine eine autokrine Stimulation zur weiteren Makrophagenaktivierung. Die aktivierten VSMC sind ihrerseits wiederum in der Lage, die oben genannte Faktoren zu bilden, und dadurch einmal sich selbst zu aktivieren und andererseits auch den Zyklus der inflammatorischen Reaktion weiterhin aufrecht zu erhalten (86). Auch Endothelzellen sind in der Lage, Mediatoren zu sezernieren. So konnte in diesen Zellen, wie auch in den VSMC, vier Stunden nach einem Gefäßtrauma die Induktion von MCP-1 und VCAM-1 nachgewiesen werden (88, 117). Durch MCP-1 werden

weitere Monozyten rekrutiert und durch VCAM-1 erfolgt, wie auch bei der Atherosklerose, die Adhäsion von T-Lymphozyten und Monozyten an der Zellwand des Endothels (86).

In den nächsten Tagen kommt es zur Invasion von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten in das subendotheliale Gewebe (55). Diese Entzündungszellen sezernieren wiederum auch Zytokine, welche die Inflammation ununterbrochen ablaufen lassen.

1.3.3 Intimahyperplasie

Die Migration und Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen, deren Matrixsynthese und die daraus resultierende Intimahyperplasie spielen eine wichtige Rolle bei der Restenose (67, 116). Bei der mikroskopischen Betrachtung der restenotischen Anteile eines Gefäßes findet man im histologischen Bild eine Vielzahl von SMC und Makrophagen, die als zelluläre Komponenten lediglich etwa 10% der Neointima ausmachen, umgeben von wenig kompakter extrazellulärer Matrix, die den Rest des Volumens einnimmt (11, 13, 35, 53, 68).

Bis zum 14. Tag nach PTA wandern die VSMC unter dem chemotaktischen Einfluss von PDGF aus der Media in die Intima ein. Dabei wird die subendotheliale Matrix durch die von den VSMC sezernierten Plasminogen-Aktivatoren degradiert. Die VSMC proliferieren weiter in der Intima und erreichen dort zum Ende der ersten zwei Wochen ihre maximale Konzentration (112). Ab dem 14. Tag bis hin zum dritten Monat nach PTA kommt es zur Intimahyperplasie. Die Wachstumsfaktoren (bFGF, IGF, EGF TGF- β und andere) und die Zytokine aktivieren die VSMC zur weiteren Proliferation (28, 61). Zusätzlich werden die VSMC, unter anderem auch autokrin, durch die Sekretion von Interleukinen und anderen Mediatoren zur Produktion von extrazellulärer Matrix stimuliert (86). Eine weitere Quelle von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sind die Makrophagen und die T-Lymphozyten. Auch die Endothelzellen sind in der Lage, extrazelluläre Matrix zu produzieren. Die Matrixsynthese erreicht ihren Höhepunkt zwei bis drei Monate nach PTA und bleibt danach konstant (18, 112).

Während der Matrixproduktion wird zunächst Fibronectin produziert, welches dann durch Proteoglykane, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat

ersetzt wird (11, 76). Die ebenfalls synthetisierte Hyaluronsäure ist in der Lage, viel Wasser zu binden und so eine lockere Matrix zu schaffen, welche die Migration der VSMC erleichtert. Die Proteoglykane werden ab dem 14. Tag durch Typ I und III Kollagen ersetzt (76). Die extrazelluläre Matrix macht am Ende bis zu 90% der hyperplastischen Intimaläsion aus (11, 13, 35, 53, 68). Die Synthese von extrazellulärer Matrix ist ein wichtiger physiologischer Mechanismus nach Gefäßverletzungen. Überschreitet das Wachstum der Neointima durch überschüssige Proliferation die für die Verletzung erforderlichen Ansprüche, kommt es zur Restenose.

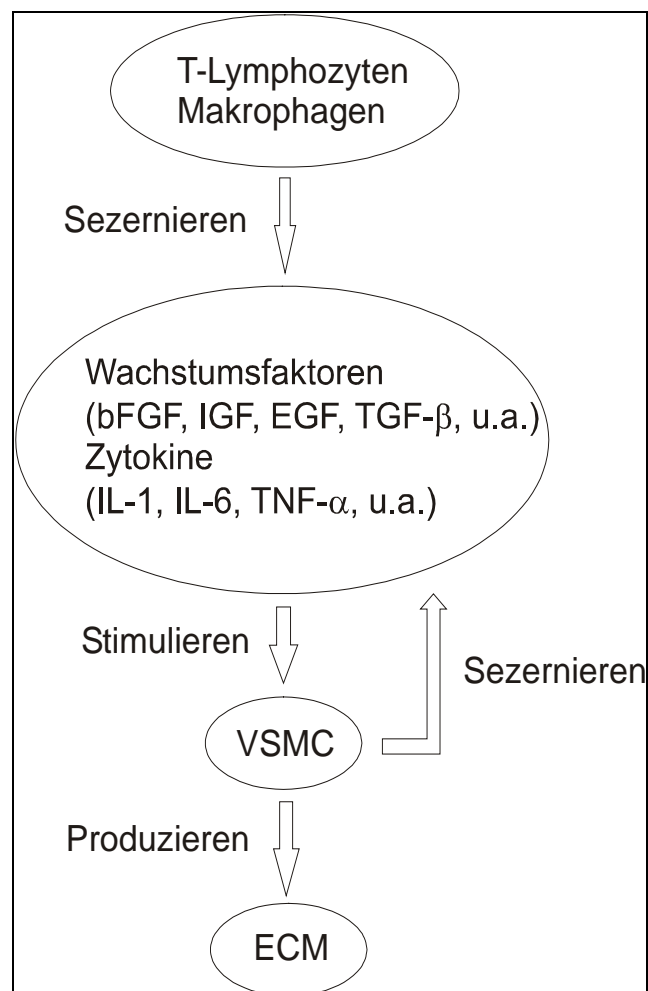


Abb. 2: Stimulation der VSMC.
In Anlehnung an Libby et al. (86)

1.3.4 Remodeling

Glagov et al. entwickelten erstmals 1987 die Theorie des kompensatorischen Remodeling (46). Unter Remodeling versteht man allgemein eine Veränderung im Durchmesser einer Arterie über einen gewissen Zeitraum, gemessen anhand der Lamina elastica externa (43, 123). Dies kann im Rahmen der Entwicklung der Atherosklerose oder auch bei der Restenose geschehen (117). Dabei laufen mindestens vier Mechanismen ab: Wachstum, Apoptose und Migration von Zellen, Produktion und Degradierung von extrazellulärer Matrix (123). Das Remodeling erfasst also sowohl eine Vergrößerung des Lumens als auch eine Verkleinerung desselben. Idealerweise dehnt sich ein Gefäß aus, um die stenosierende Wirkung der Intimahyperplasie auszugleichen. Das Lumen bleibt unverändert. Eine Rolle dabei könnten die Matrixmetalloproteinasen (MMP) spielen (11, 35).

Bei ihnen handelt es sich um eine Familie von Zink- oder Calcium-abhängigen Enzymen, die als Proenzyme sezerniert werden und in der Lage sind, Kollagen abzubauen. Ihre Aktivität wird sehr genau reguliert, unter anderem durch die Inhibitoren der MMP (=tissue inhibitors of matrix metalloproteinases; TIMP). Es besteht möglicherweise eine inverse Beziehung zwischen der Menge an Kollagen in einem Gefäß und der Aktivität der MMP. Je niedriger der Kollagengehalt, desto höher ist der Grad der Matrixdegradierung (35).

Von einem pathologischen Remodeling spricht man, wenn das Gefäß sich trotz Intimahyperplasie nicht ausdehnt oder sich sogar kontrahiert. Der Zusammenhang zwischen der Intimahyperplasie und dem Remodeling ist dabei von Bedeutung. Während bei der Atherosklerose das Gefäßlumen mit steigender Intimafläche bis zu einem bestimmten Grad zunimmt, scheint bei der Restenose das Gegenteil der Fall zu sein. Mit zunehmendem Grad der Intimahyperplasie nimmt das Remodeling ab (26). Die Ursachen des Remodeling sind unbekannt. Diskutiert werden Endotheldysfunktion oder Kollagendeposition als Ursachen der chronischen Kontraktion (13).

1.4 Therapieansätze

1.4.1 Konventionelle systemische Pharmakotherapie

Bis dato konnte in zahlreichen klinischen Studien kein zufriedenstellender Therapieansatz für das Problem der Restenose gefunden werden. Es wurden bislang vielversprechende Ergebnisse sowohl durch *in vitro*-Versuche als auch im Tiermodell erzielt. Aber die systemische Applikation von antiproliferativ oder antithrombotisch wirkenden Substanzen konnte in den klinischen Studien nicht überzeugen. Die Gründe dafür sind zahlreich und in vielen Bereichen zu suchen (34, 52, 71, 87, 106, 144).

Zwei Studien, die MERCATOR Studie (Multicenter European research trial with Cilazapril after angioplasty to prevent transluminal coronary obstruction and restenosis) und die MARCATOR Studie (Multicenter American research trial with Cilazapril after angioplasty to prevent transluminal coronary obstruction and restenosis), geben die momentane Situation wieder. Diesen Studien gingen Tierversuche voraus, die zeigten, dass die Infusion von Angiotensin II zur Proliferation von VSMC führen kann (27). Die auf dieser Erkenntnis aufbauenden Tierversuche wiesen eine dosisabhängige Reduktion der Neointimabildung nach einem Gefäßtrauma durch Hemmer des Angiotensin-converting Enzyms, also durch ACE-Hemmer, nach (113). In den klinischen Studien sollte nun die Wirkung von ACE-Hemmern, in diesen Studien Cilazapril, auf die Restenose untersucht werden. Dabei stieß man auf das Problem der Dosierung des Therapeutikums. In der MERCATOR Studie wurde eine Höchstdosis von zweimal täglich 5 mg Cilazapril gewählt. Hier zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Placebo und den mit Cilazapril behandelten Patienten bezüglich einer Reduktion der Restenoseraten. In der MARCATOR Studie betrug die Höchstdosis zweimal täglich 10 mg. Diese lag jedoch immer noch um mehr als das 10fache unter der Dosierung, die durch Extrapolation der Tierversuchsdaten errechnet worden waren. Eine Dosissteigerung war aber aufgrund der fehlenden Daten über die Nebenwirkungen höherer Konzentrationen, wie z.B. arterielle Hypotonie, nicht möglich. Auch in dieser Studie wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den mit unterschiedlichen Medikamentendosen behandelten Patienten hinsichtlich der

Raten der Rezidivstenose festgestellt (14, 34, 84, 96). Somit könnte eine mögliche Erklärung für das Versagen der bisherigen klinischen Versuche sein, dass die im Patienten applizierten Dosierungen des jeweils zu testenden Pharmakons aufgrund der zu befürchtenden systemischen Nebenwirkungen viel geringer waren als die in den Tierversuchen getesteten Dosierungen (53, 84, 115).

Viele weitere klinische Studien mit systemischer Applikation von unterschiedlichen Substanzen wurden durchgeführt, von denen hier nur die ERA-Studie mit dem niedermolekularem Heparin Enoxaparin (33) und eine Studie mit dem HMG-CoA-Reduktasehemmer Lovastatin (143) erwähnt werden sollen, die jedoch keine Erfolge verzeichnen konnten (33, 84, 143).

1.4.2 Stents

Die Verwendung von Stents insbesondere in Koronararterien stellt ein heute sehr weit verbreitetes Verfahren dar (139). Die Vorteile der Stents bestehen in der Prophylaxe des Gefäßspasmus und des „elastic recoils“ und längerfristig in der Prophylaxe des konstriktiven Remodeling (146).

Schon im Jahre 1994 zeigte sich in mehreren klinischen Multicenterstudien, unter anderem in der Benestent Studie und der STRESS Studie (Stent restenosis study trial), eine signifikante Verringerung der Restenoseraten bei mit Stent behandelten Patienten im Vergleich zu Patienten, die eine alleinige Ballonangioplastie erhalten hatten (20, 37, 39, 125).

Jedoch tritt auch bei der Stentimplantation langfristig das Problem der In-Stent Restenose wieder auf, denn der Stent kann die Restenose durch Intimaproliferation nicht ganz verhindern (32). Die im Stent auftretende Restenose kommt weniger häufig vor als die Restenose nach Ballonangioplastie, ist aber als komplizierter zu betrachten, da sie weniger einfach therapiert werden kann (128). Sobald Gewebe über den Stent gewachsen ist, ist dieser nicht mehr leicht zu entfernen. Die restenotischen Areale im Stent sind zellreicher als die restenotischen Bereiche entlang einer Arterie und setzen sich vor allem aus vaskulären glatten Muskelzellen zusammen (78, 98). Der Stent bietet jedoch die Möglichkeit der lokalen Applikation von Medikamenten. Es können beschichtete Stents implantiert werden, welche

über einen längeren Zeitraum hinweg das jeweilige Therapeutikum abgeben können.

In Studien zur Prophylaxe der Restenosierung in Stents machte man sich die ionisierenden Strahlen zunutze, denn es hatte sich zuvor in experimentellen Studien gezeigt, dass radioaktive Strahlen eine Hemmung der Zellproliferation und der Produktion von extrazellulärer Matrix bewirken (57, 82). Mit Hilfe von radioaktiven Stents, die in geringen Dosisraten über einen langen Zeitraum wirken, konnte eine Hemmung der Neointimabildung erzielt werden (57, 82). Aber auch hier sind die Ergebnisse von Langzeitstudien nicht zufriedenstellend. Zudem sind die langfristigen Auswirkungen der Strahlentherapie nicht bekannt (82, 146).

Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz scheint der Sirolimusstent zu sein. Dieser ist mit dem Immunsuppressivum Sirolimus (Rapamycin), das die Proliferation von Lymphozyten und glatten Muskelzellen hemmt, beschichtet. In einer ersten Studie von Sousa et al. zeigte sich bei keinem der Patienten innerhalb von zwei Jahren nach Implantation des Stents eine relevante In-Stent Restenose (129). In der RAVEL Studie mit 238 teilnehmenden Patienten wurde der Sirolimusstent mit einem herkömmlichen Stent verglichen. Hier kam es bei 26% der mit einem Standardstent behandelten Patienten zu einer Restenose, während in der Sirolimusgruppe keiner der Patienten eine Restenose entwickelte (99).

1.4.3 Gentherapeutische Ansätze

Der in dieser Studie untersuchte Therapieansatz ist die vaskuläre Gentherapie. Es sind viele Gene bekannt, die beim Pathomechanismus der Restenose eine entscheidende Rolle spielen. Die Gentherapie stellt deshalb einen auf einer übergeordneten Ebene zur Wirkung kommenden Therapieansatz dar. In Analogie zur konventionellen Pharmakotherapie, bei der bestimmte Substanzen in den Körper gebracht werden, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen, versteht man unter der somatischen Gentherapie die Einschleusung von rekombinanten Genen oder DNA in somatische Zellen (138). Bevor genauer auf die Gentherapie eingegangen werden kann, müssen zum besseren Verständnis der Wirkungsweise der Gentherapie einige Grundlagen aufgezeigt werden.

Muss eine Zelle auf geänderte Umweltbedingungen reagieren, wird die Expression derjenigen Gene aktiviert, die den genetischen Code für die Proteine besitzen, die zur Reaktion auf die neue Umweltsituation benötigt werden. Dies läuft in mehreren Schritten ab: Transkription, Translation und Proteinbiosynthese. Um gezielt auf einzelne Reize antworten zu können, ist es von besonderer Bedeutung, dass die Genexpression der Zelle reguliert wird. Prinzipiell kann dies an allen oben genannten Punkten geschehen.

Da in dieser Arbeit der Transkriptionsfaktor NF- κ B untersucht worden ist, soll nun genauer auf die Transkription als Ansatzpunkt der zellulären Genregulation eingegangen werden.

Bei der Transkription wird eine Kopie eines Gens in Form eines einsträngigen RNA-Moleküls hergestellt. Dies geschieht unter Mithilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II. Eukaryote RNA-Polymerasen können jedoch nicht alleine an die DNA binden, sondern benötigen dazu Transkriptionsfaktoren, mit denen sie den sogenannten Initiationskomplex bilden. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, welche, durch einen bestimmten Stimulus aktiviert, an spezifische Nukleotidsequenzen binden. Bei den Sequenzen handelt es sich entweder um die Promotorregion oder um den Enhancer eines Gens. Die Promotorregion hilft der RNA-Polymerase beim Auffinden der Startstelle der Transkription. Die Enhancer (=engl. Verstärker), auch Cis-aktivierende Elemente genannt, liegen einige hundert Basenpaare oberhalb des Promotors (in Einzelfällen auch innerhalb oder unterhalb des Gens). Sie können die Transkription von Genen um ein Vielfaches steigern. Hat sich der Initiationskomplex gebildet, ist die RNA-Polymerase II nun in der Lage, die richtige Startstelle der Transkription zu finden und die Transkription des Gens zu beginnen (89).

Gentherapeutisch kann man auf unterschiedlichen Ebenen tätig werden. Die Gentherapie macht sich die Regulationsmechanismen der Zellen zunutze. Die heute am häufigsten verwendeten Strategien sind die Genverstärkung und die Genblockade. Bei der Genverstärkung wird genetisches Material in das Genom des Patienten eingeschleust, ohne die ursprüngliche DNA zu verändern oder zu entfernen. Die Genverstärkung wird hier nur am Rande erwähnt, denn in dieser Studie wurde mit der Genblockade gearbeitet. Dabei gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Mechanismen der Genblockade: die Verwendung von Transkriptionsfaktor-decoys oder von antisense-Oligonukleotiden (ODN). Bei der Verwendung von antisense-ODN befindet sich der Angriffspunkt eine Ebene unter der Transkriptionsebene, bei der Prozessierung der prä-mRNA. Bei der Transkription wird nur einer der beiden DNA-Stränge transkribiert. Per definitionem ist dies der antisense-Strang, wohingegen der komplementäre sense-Strang im allgemeinen nicht transkribiert wird. Zunächst entsteht bei der Transkription eine einzelsträngige prä-mRNA, welche dieselbe Sequenz wie der sense-Strang der DNA hat. Einzige Ausnahme ist die Substitution der Base Uracil durch die Base Thymin. Die prä-mRNA wird weiter prozessiert durch das Splicing, das Hinzufügen eines Polyadenin-Rests am 3'-Ende und durch eine Kappe am 5'-Ende. Die fertiggestellte mRNA verlässt den Zellkern und gelangt ins Cytoplasma, wo an den Ribosomen die Translation stattfindet. Die Prozessierung der prä-mRNA kann nun gestört werden, indem sich ein kurzer Abschnitt der einzelsträngigen mRNA in Anwesenheit einer komplementären antisense-Sequenz zu einem Doppelstrang zusammenfügt. Die Nukleotidsequenz kann entweder RNA oder DNA sein. Es reicht eine Länge von 11-25 Basen aus, um spezifisch gegen die mRNA gerichtet zu sein.

Die Transkriptionsfaktor-decoys wirken auf der Ebene der Transkription selbst. Bei ihnen handelt es sich um synthetische, doppelsträngige Oligonukleotid-Sequenzen, welche die Konsensussequenz eines Promotors oder Enhancers eines Gens beinhalten (138). Die decoy-Oligonukleotide konkurrieren mit dem Gen als cis-Elemente um die Bindung des Transkriptionsfaktors. Hat der Transkriptionsfaktor an die decoy-Oligonukleotide gebunden, kann keine Transkriptionsverstärkung stattfinden (89, 94, 138).

1.5 NF- κ B-/I- κ B- Familie

1.5.1 Der Aufbau von NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor kappa B) wurde im Jahre 1986 von der Gruppe um David Baltimore entdeckt und zunächst als B-Zell spezifischer Faktor beschrieben, welcher in der Lage ist, an eine kurze, regulatorische DNA-Sequenz des Ig- κ L-Kette Enhancers zu binden (124).

Auch heute steht er im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Gründe dafür sind unter anderem die Beteiligung an einer Vielzahl von Erkrankungen, die ungewöhnliche Regulation, die Stimulation durch unterschiedliche Mediatoren wie z.B. physikalischer und chemischer Stress, proinflammatorische Zytokine und T- und B- Zell Mitogene, und die Kontrolle verschiedener Gene und biologischer Reaktionen. Beim Klonieren der NF- κ B-Untereinheiten wurde eine ganze Transkriptionsfamilie entdeckt. Aktuell kennt man fünf Mitglieder: p50/p105, p65/RelA, c-Rel, RelB und p52/p100. Alle Untereinheiten, mit Ausnahme von RelB, können sowohl homodimerisieren als auch untereinander Heterodimere bilden. Allen gemeinsam ist eine zentrale, homologe Region, die Rel Domäne. Diese spielt eine Rolle bei der DNA-Bindung, der Dimerisierung und der Interaktion mit I- κ B Molekülen. Die klassische Form ist jedoch das Heterodimer aus den Untereinheiten p65/RelA und p50 (9, 50, 60, 88, 134).

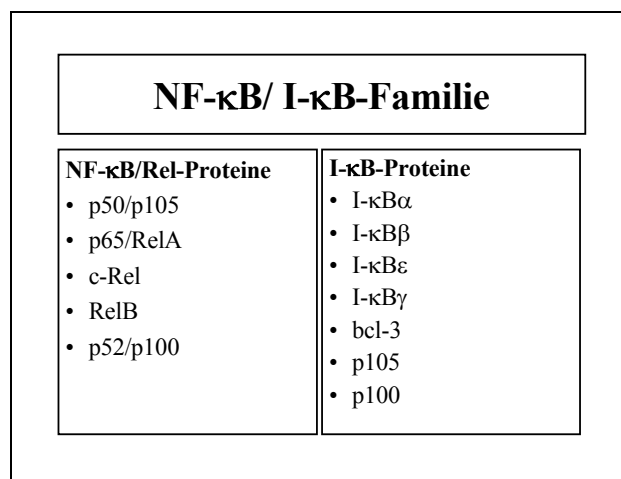


Abb. 3: NF- κ B/ I- κ B-Familie

1.5.2 Der Aufbau von I- κ B

Im Cytoplasma liegt NF- κ B in inaktiver Form an den Inhibitor von κ B, dem I- κ B, gebunden vor, durch den NF- κ B reguliert wird. I- κ B hat ein Molekulargewicht von 37–43 kD und besteht aus den Isoformen I- κ B α , I- κ B β , I- κ B ϵ und I- κ B γ . Weitere Mitglieder der I- κ B-Familie sind Bcl-3, p100 und p105. Die verschiedenen I- κ B- Moleküle haben eine unterschiedliche Gewebeverteilung und unterschiedliche Wirkungen auf die verschiedenen NF- κ B-Dimere. Die größte Bedeutung kommt dabei I- κ B α , I- κ B β und I- κ B ϵ zu. I- κ B α ist wichtig für die vorübergehende Aktivierung von NF- κ B und bindet das p50-p65 Heterodimer und das p50 Homodimer. I- κ B β bewirkt eine anhaltende Aktivierung und bindet p50-p65, p50-RelB und p50-c-Rel. In den Endothelzellen ist I- κ B ϵ mit p65 und zu einem geringeren Ausmaß mit c-Rel assoziiert. I- κ B α und I- κ B β binden hier nur an p65 (9, 50, 60, 88, 130, 134).

1.5.3 Die Aktivierung von NF- κ B

Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch den I- κ B-Kinase-Komplex (IKK), welcher aus den katalytischen Untereinheiten IKK- α , IKK- β (auch als IKK-1 und IKK-2 bezeichnet), der regulatorischen IKK- γ Untereinheit und wahrscheinlich weiteren, weniger wichtigen Komponenten besteht. Der IKK-Komplex gehört zu einer Familie von intrazellulären Signaltransduktionsenzymen mit einer C-terminalen Region mit einem Leucin-Zipper, einem Helix-Loop-Helix Motiv und einer N-terminalen Kinasedomäne. Die häufigste Form ist das IKK- α /IKK- β Heterodimer verbunden mit IKK- γ . Die IKK- γ ist keine eigentliche Kinase, ist aber essentiell für die NF- κ B Aktivierung durch unterschiedliche Mediatoren. Aupperle et al. konnten nachweisen, dass v.a. IKK- β eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von NF- κ B durch entzündungsfördernde Stimuli wie Interleukin-1 und TNF- α spielt (4).

Die Aktivierung des IKK-Komplexes durch Phosphorylierung wird durch weitere Kinasen kontrolliert. Dazu zählen NF- κ B-inducing kinase (NIK) und Mitogen-

activated Proteinkinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1 (MEKK1), welche beide zur Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) Familie gehören. Des weiteren zählen dazu: TGF- β -activated kinase (TAK 1), Proteinkinasen C, R und B, Mixed-lineage kinase 3 (MLK3) und NF- κ B-activating kinase (9, 50, 60, 88, 134).

Li et al. konnten nachweisen, dass zumindest MAPKKK, MEKK und die Proteinkinase C durch mechanischen Stress, wie er bei der Ballonangioplastie auftritt, aktiviert werden (85).

Nach der Phosphorylierung und Aktivierung des IKK-Komplexes phosphoryliert dieser das an NF- κ B gebundene I- κ B α an Serin in Position 32 und 36, welches daraufhin durch einen Ubiquitin-Ligase Komplex polyubiquiniert wird. Dabei wird eine Polyubiquitinkette kovalent an I- κ B geknüpft. Dies dient dem 26S-Proteosom, einem großen Komplex zum Abbau von cytosolischen Proteinen, als Signal für den Abbau von I- κ B. Das I- κ B wird folglich degradiert und NF- κ B freigesetzt (149). Die Phosphorylierung von I- κ B β führt zur anhaltenden Aktivierung von NF- κ B mit einer verzögerten Resynthese des I- κ B β . Lindner konnte eine Abnahme des I- κ B α und I- κ B β Spiegels 15 min nach Stimulation messen. Nach 60 min wurde I- κ B α wieder exprimiert, wohingegen nahezu kein Anstieg des I- κ B β Spiegel zu messen war (88).

Nach der Freisetzung von I- κ B aus dem I- κ B-/NF- κ B-Komplex, werden die NF- κ B-Dimere in den Zellkern transloziert. Im Kern selbst bindet NF- κ B an die Enhancer-Elemente der Zielgene mit der Konsensussequenz 5'-GGGACTTCC-3'. NF- κ B ist einer der wichtigsten Faktoren proinflammatorischer Genregulation. Er stimuliert die Transkription verschiedener für die Pathophysiologie der Gefäßwand wichtiger Gene. Zu diesen Genen gehören Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , Interferon- γ), Chemokine (z.B. MCP-1, Leukozyten-Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) und die Zellproliferation regulierende Gene (103, 109).

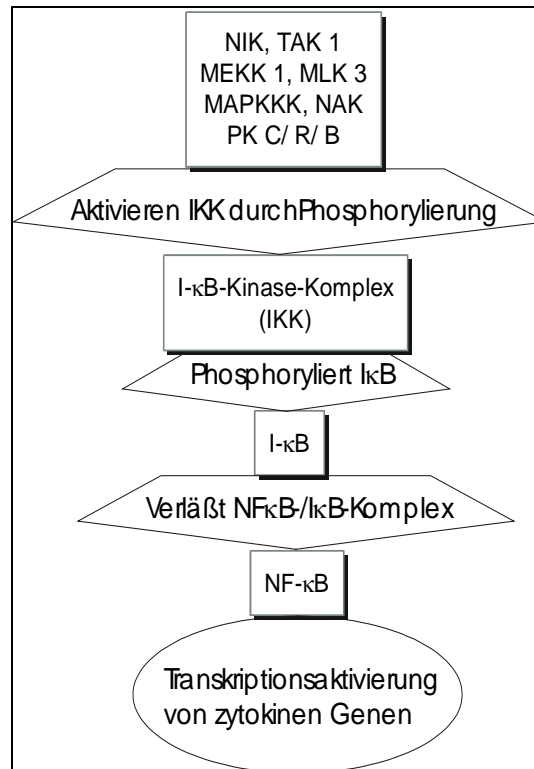


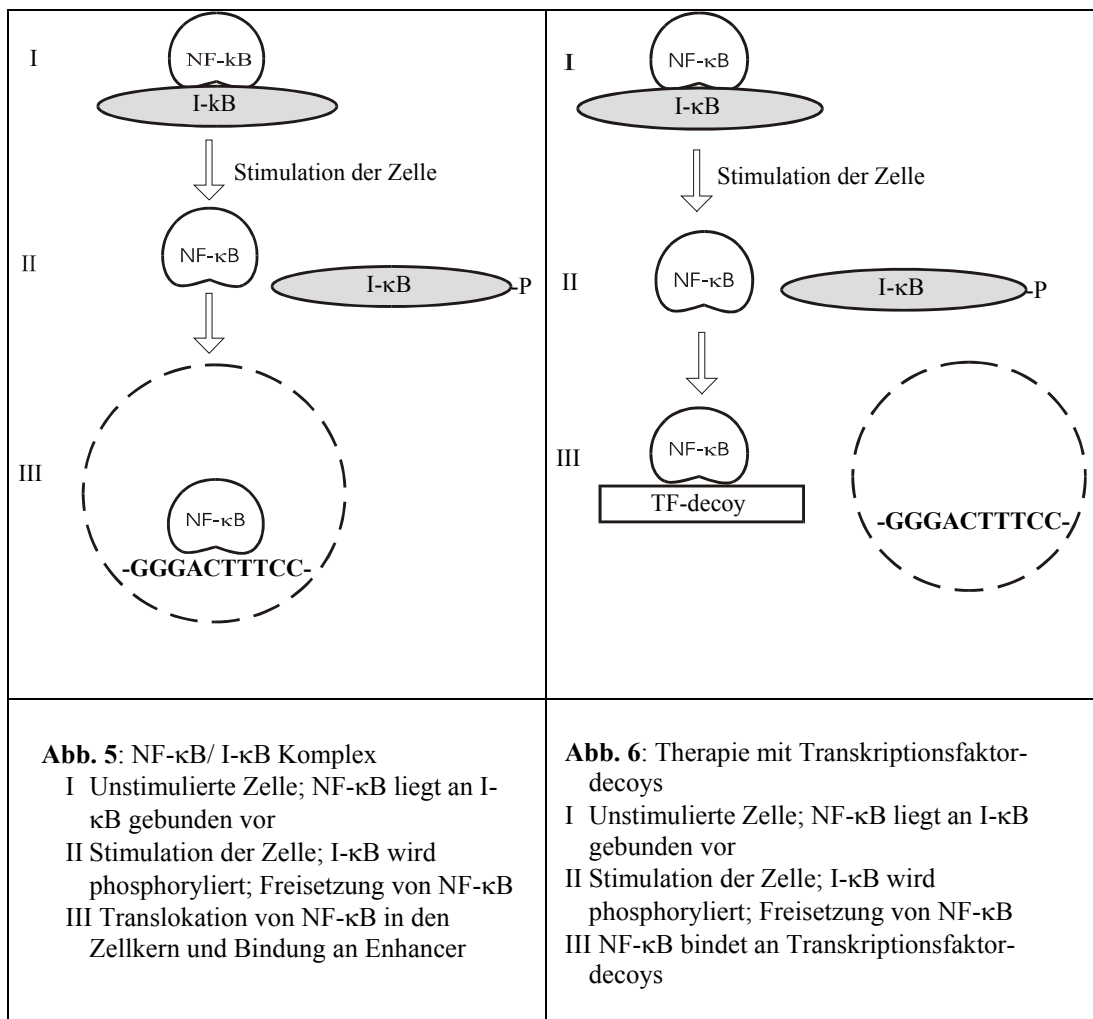
Abb. 4: Aktivierung von NF-κB

1.5.4 Die Bedeutung von NF-κB im Rahmen der Restenose

Wie oben erwähnt, spielt NF-κB durch die Transaktivierung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen eine bedeutende Rolle im Rahmen der Entzündungsreaktion. Durch die PTA wird ein Trauma mit nachfolgenden reparativen und inflammatorischen Vorgängen gesetzt, welche eine Schlüsselrolle bei der Intimahyperplasie spielen (20). Da diese Reaktionen durch Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst werden, nimmt man an, dass NF-κB auch an der Pathogenese der Restenose beteiligt ist (5).

Obata et al. zeigten eine Induktion von NF-κB in den Nuklei von VSMC durch mitogene Stimulanzien wie PDGF-BB, bFGF, EGF und IGF-1. Dies spricht dafür, dass die Induktion von NF-κB in Zusammenhang mit der Proliferation von VSMC steht (109). Nakajima et al. fanden eine Beteiligung der NF-κB Aktivierung bei der Thrombin-induzierten Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen. Sie wiesen einen Zusammenhang zwischen der Stimulation des Thrombin-Rezeptors und der NF-κB Aktivität nach.

Weiterhin zeigten sie, dass antisense-ODN der p65-Untereinheit des NF- κ B anti-proliferative Effekte auf die VSMC *in vitro* haben (105). Lindner wies die Expression von VCAM-1 und MCP-1 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen als eine Folge der NF- κ B Aktivierung nach (88).



1.6 Lokale Pharmakotherapie

Wie bereits in Abschnitt 1.4 erwähnt, gibt es unterschiedliche pharmakologische Ansätze zur Restenoseprophylaxe. Dabei ist die Applikationsweise des Therapeutikums von Bedeutung. Man hat hier die Auswahl zwischen systemischer und lokaler Pharmakotherapie.

Klinische Studien mit systemischer Medikamentapplikation haben keine signifikanten Erfolge gebracht, weshalb heute der Schwerpunkt auf die lokale Administration gelegt wird (114, 115). Die Gründe dafür sind theoretisch einfach. Man kann davon ausgehen, dass bei der systemischen Therapie die Konzentration des Wirkstoffes am Wirkungsort, der Gefäßwand, zu niedrig ist, um eine adäquate Wirkung zu erzielen. Um hohe Konzentrationen in der Gefäßwand zu erzielen, muss man die systemisch injizierte Dosis um ein Vielfaches steigern, was mit erheblichen systemischen Nebenwirkungen einhergeht. Zudem ist der Wirkspiegel der Substanz im Blut zeitlich begrenzt (1, 25, 36, 48, 115). Die lokale Pharmakotherapie bietet den Vorteil von hoher lokaler Konzentration bei gleichzeitig niedriger systemischer Konzentration eines Wirkstoffes. Die Effizienz lokaler Pharmakotherapie gibt den Anteil einer Substanz wieder, welche den Katheter verlässt und daraufhin in der Wand deponiert wird. Sie wird bei 0,01% - 1,3% angesiedelt (1, 17), liegt aber dabei noch um das annähernd Tausendfache über der Konzentration, die man mit der systemischen Therapie erreichen kann (17). Verschiedene Studien bestätigen die Wirksamkeit der lokalen Medikamentenapplikation (20, 49, 73, 75, 136). Für die lokale Therapie ist es von besonderer Bedeutung, ein geeignetes Kathetersystem zur Medikamentenapplikation zu wählen. Wichtig ist dabei, dass die verwendete Substanz in erforderlicher Dosis in der Gefäßwand platziert werden kann und zwar mit minimalem Trauma für die Wand. Die Retention der Substanz am Wirkungsort muss lang genug andauern, um einen therapeutischen Effekt zu gewährleisten. Die Perfusion peripher gelegener Gefäße darf während der Applikation nicht zum Erliegen kommen (17, 36).

Die lokale Pharmakotherapie kann jedoch auch durch einige Faktoren limitiert werden. Zu diesen zählen, betrachtet man sie vor allem im Hinblick auf die Gentherapie, die

- Applikationseffizienz, die
- Retention des Medikaments in der Gefäßwand und die
- Transfektionseffizienz (17).

In atherosklerotisch veränderten Gefäßen wird die applizierte Substanz vor allem in die leicht zugänglichen Dissektionsflächen und die Seitenäste eingebracht. Eine direkte Einlagerung in die Intima oder in die Media wird dahingegen seltener

beobachtet. Die Wirkung der lokalen Pharmakotherapie kann dadurch limitiert werden, da das Therapeutikum nicht die eigentlichen Zielzellen erreicht. Zu einem geringen Prozentsatz proliferieren die glatten Muskelzellen jedoch auch in den Dissektionsbereichen, welche für das Pharmakon zugänglich sind (17). Wichtig für eine hohe Applikationseffizienz ist die Auswahl eines geeigneten Kathetersystems. Die in die Gefäßwand deponierten Substanzen können innerhalb von Minuten bis Stunden ausgeschwemmt werden. Insbesondere kann das passieren, wenn die Substanz keine spezifischen intramuralen Bindungseigenschaften besitzt. Eine Lösungsmöglichkeit stellt die Verwendung von Nanopartikeln dar. Diese bestehen zumeist aus abbaubaren Polymeren, die mit dem jeweiligen Pharmakon beschichtet sind und dieses langsam freisetzen. Aufgrund der geringen Größe der Mikropartikel werden diese nicht so schnell ausgewaschen (17, 115). Dieses Problem ist bei der Verwendung von Oligonukleotiden nicht von allzu großer Bedeutung, da sie, einmal intrazellulär aufgenommen, über einen langen Zeitraum hinweg an intrazelluläre Moleküle binden und die Genexpression der Zellen beeinflussen können.

Um Aussagen über die Transfektionseffizienz machen zu können, muss man zunächst berücksichtigen, ob die durch die verstärkte Genexpression synthetisierten Proteine intrazellulär verbleiben oder sezerniert werden. Eine Überexpression von nicht-sezernierten Proteinen begrenzt die Wirkung der Gentherapie ausschließlich auf die transfizierten Zellen, während sezernierte Proteine parakrin auf die Nachbarzellen wirken können und es hier einer geringeren Transfektionseffizienz bedarf (115). Oligonukleotide wirken intrazellulär und verhindern die Synthese von Mediatoren. Die Retention einer Substanz ist bei der Verwendung von genetischem Material wie oben erwähnt ein geringeres Problem, denn aufgrund der Bindung an intrazelluläre Moleküle hält die Wirkung über einen längeren Zeitraum an (17). Andere Substanzen hingegen, die keine zellbindenden Eigenschaften besitzen, können, noch bevor sie biologisch relevante Wirkungen erzielen, ausgewaschen werden.

Vielmehr stellt die Transfektion der Zelle das Hauptproblem dar. Um DNA in eine Zelle einzubringen, werden Vektoren benötigt. Man unterscheidet virale von nicht-viralen Vektoren. Viren sind naturgemäß zur Einschleusung von genetischem

Material in eine Zelle fähig. Als virale Vektoren werden vor allem Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Herpesviren, HI-Viren und Retroviren verwendet. Viren bergen jedoch das Risiko der Immunogenität, was eine Wiederverwendung desselben Vektors unmöglich macht und somit die Therapiemöglichkeiten limitiert. Weiterer Nachteil ist, dass die Integration viraler DNA an einer ungeeigneten Stelle Onkogene aktivieren kann. Nach viraler Genexpression kann es zudem durch Bildung von viralen Proteinen zu sekundären toxischen Nebenwirkungen kommen (17, 94, 95, 115, 128, 138).

Liposomen sind nicht-virale Vektoren, die auch in dieser Studie verwendet wurden. Bei Liposomen handelt es sich um konzentrisch aufgebaute Lipiddoppelschichten. Dazwischen befindet sich eine wässrige Phase, in der sich wasserlösliche Stoffe einlagern können. Die Liposomen sind kationisch geladen und können so die negativ geladenen ODN besser an sich binden. Sie sind nicht-infektiös, können große DNA-Moleküle inkorporieren und werden relativ leicht synthetisiert. Ihnen fehlt jedoch in unmodifizierter Form die Fähigkeit, spezifische Zellen anzugreifen (15, 17, 94, 95, 115, 128, 138).

1.7 Kathetersysteme zur lokalen Pharmakotherapie

Die Wahl eines geeigneten Applikationssystems ist bei der lokalen Pharmakotherapie von besonderer Bedeutung. Es gibt unterschiedliche Kathetertypen, die sich des Mechanismus der

- passiven Diffusion, der
- physikalischen Applikation oder der
- Erzeugung eines Druckgradienten durch Injektion

bedienen (8, 29).

Zum Typ der passiven Diffusion zählen beispielsweise der double-balloon Katheter und der Hydrogel-Katheter. Der double-balloon Katheter war der erste Katheter, der zur Medikamentenapplikation verwendet wurde (72). Er besteht aus zwei Ballons mit separatem Lumen und einem Lumen zwischen den zwei Ballons zur Applikation. Die Applikation erfolgt durch passive Diffusion oder hydrostatischen Druck. Die Substanz wird bei einem Applikationsdruck von 300

mm Hg transmural, ohne lokales Trauma aufgenommen (7, 17). Zu den Nachteilen des Ballons zählt der Substanzverlust in die Seitenäste, welche sich zwischen den zwei Ballons befinden. Zudem verhindern die prolongierten Inflationszeiten von bis zu 30 min, die für eine adäquate transmurale Applikation notwendig sind, die antegrade Perfusion, was zu einer regionalen Ischämie führt. Eine Dilatation des stenotischen Areal ist mit diesem System außerdem nicht möglich (8).

Der Hydrogel-Katheter besteht aus einem Standard-Ballonkatheter mit hydrophiler Polymerbeschichtung. Mit dem Hydrogel-Katheter ist die simultane Pharmakotherapie und die Ballonangioplastie möglich. In die hydrophile Polymerbeschichtung kann die zu applizierende Substanz in einer wässrigen Trägerlösung aufgenommen werden. Die schwammartige Oberfläche dehnt sich dabei von 5 bis maximal 25 μm aus. Die Trägerkapazität des Katheters ist jedoch begrenzt. Fram et al. berichteten, dass etwa 550 Einheiten Urokinase an einen 4 mm messenden Ballon absorbieren, wovon lediglich 3-4 Einheiten in die Gefäßwand eingebracht werden konnten. Dies entspricht einer Applikationseffizienz des Katheters von nur etwa 0,5 % (40). Auch wird die absorbierte Substanz leicht mit dem Blutstrom ausgeschwemmt.

In den Bereich der physikalischen Applikationssysteme fallen z.B. der iontophoretische Ballonkatheter oder der Nadelinjektionskatheter. Sie machen sich aktive, physikalische Eigenschaften zunutze, um den Transport einer Substanz zu erleichtern. Bei der Iontophorese werden mit Hilfe von elektrischem Strom geladene Moleküle durch die poröse Membran des Katheters in die Gefäßwand transportiert. Der Strom fließt dabei zwischen einer im Ballon befindlichen Kathode und einer auf die Haut des Patienten aufgebrachten Anode. Das hierbei auftretende Trauma an der Gefäßwand ist gering, die Verteilung des Medikaments erstreckt sich bis in die Adventitia hinein und die Menge der applizierten Substanz in der Gefäßwand ist bis um das 80fache größer als bei anderen Methoden (36).

Mit dem Nadelinjektionskatheter kann die Gefäßwand direkt punktiert werden. Je nach verwendetem System hat dieser Katheter drei bis sechs Injektionsnadeln. Diese befinden sich in einem Metallgehäuse an der Spitze des Katheters und sind kreisförmig angeordnet. Sie können mit Hilfe eines Schubmechanismus'

ausgefahren werden. Das Trauma ist gering und wenig Substanz gelangt in den Blutkreislauf. Die Applikation erfolgt bis in die Adventitia hinein und die verwendete Substanz kann bis zu drei Wochen nach Intervention in der Wand nachgewiesen werden (29, 47, 48).

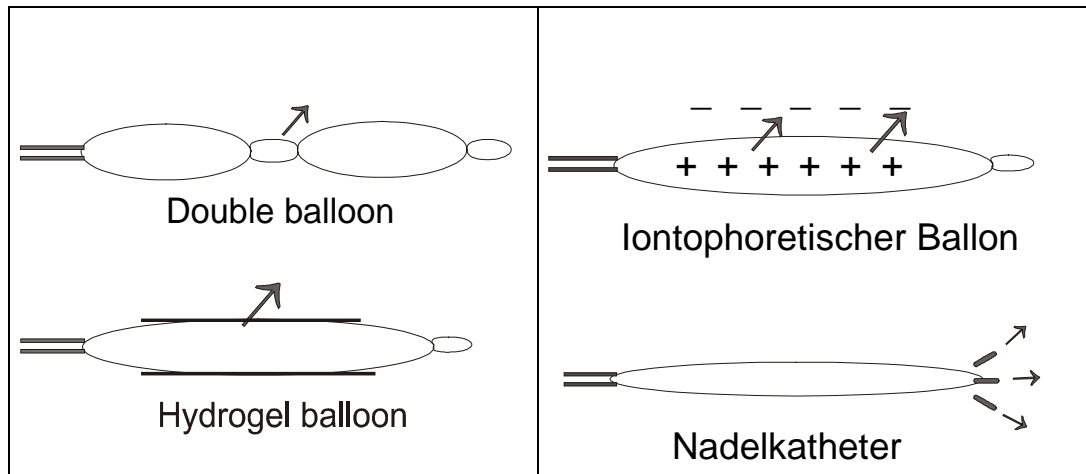


Abb.7: Die unterschiedlichen Kathetersysteme. In Anlehnung an Bailey (8)

Der in der hier vorliegenden Studie verwendete Katheter, der *channeled-balloon* Katheter, auch als *Remedy-Katheter* bezeichnet, wurde von Hong et al. erstmals beschreiben und funktioniert durch Druckapplikation einer Substanz (63). Beim *channeled-balloon* Katheter handelt es sich um einen dreilumigen Katheter mit zwei separaten Anschlüssen zur simultanen Ballondilatation und Medikamentenapplikation. In der Wand des Ballons befinden sich 18 Kanäle. Jeder Kanal enthält eine Gruppe von 30 µm durchmessenden Poren, welche wiederum in einem spiralförmigen Muster entlang des Ballons angeordnet sind und sich nach außen, d.h. zum Gefäßlumen hin, öffnen. Über den Medikamentenport kann durch die Kanäle hindurch die lokale Pharmakotherapie unabhängig von einer Balloninflation erfolgen. Durch dieses „duale System“ erfolgt die Trennung von Inflations- und Applikationsdruck – es können gleichzeitig eine Ballonangioplastie bei hohem Druck und die Medikamentenapplikation bei niedrigen Drücken durchgeführt werden (63).

Die Inflation des Ballons erfüllt hier den Zweck des besseren Wandkontaktes. Bei unebener Wand, wie z.B. durch einen Plaque bedingt, kann es zum Verlust von Injektionslösung kommen (8). Hong et al. geben die Applikationseffizienz des

Katheters zwischen 24 % und 48 % an. Die Vorteile des channeled-Balloons sind, dass hier die Angioplastie und die Pharmakotherapie zur gleichen Zeit und nicht nacheinander erfolgen und der Wirkungsbeginn der verwendeten Substanz zusammen mit der Dilatation erfolgt. Um Strömungseffekte zu verringern wurden die Poren auf 100 µm Durchmesser vergrößert.

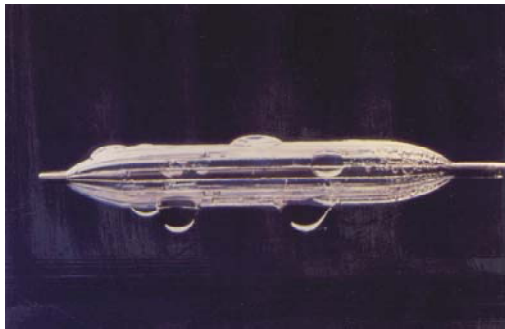


Abb. 8: Channeled-balloon Katheter, Seitansicht

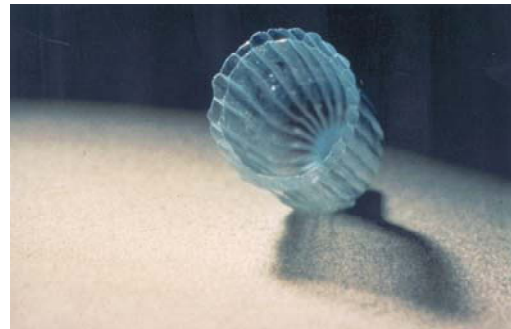


Abb. 9: Channeled-balloon Katheter, Querschnitt

1.8 Fragestellung

Die hohen Restenoseraten nach der Ballonangioplastie bleiben weiterhin ein ungelöstes Problem und limitieren den Erfolg der PTA langfristig.

Es liegen sowohl Ergebnisse von *in vitro*-Versuchen (105, 109) als auch von tierexperimentellen Studien (21) vor, die eine Aktivierung des NF-κB-/I-κB-Systems in den vaskulären glatten Muskelzellen durch Gefäßtraumen bestätigen (88).

Dass eine Hemmung des NF-κB gentherapeutisch möglich ist, konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bekräftigt werden. Dabei wurden unterschiedliche Ansätze, wie z.B. die Verwendung von antisense-Oligonukleotiden oder die Applikation von I-κBα, gewählt. Es konnte nicht nur eine Hemmung von NF-κB erzielt werden, sondern es kam durch die Inhibition von NF-κB zu einer Reduzierung der Neointimabildung (5, 20, 102).

In dieser tierexperimentellen Studie sollte die Wirkung von NF- κ B-decoy-Oligonukleotiden auf die Gefäßwand hinsichtlich der Neointimabildung nach Ballonangioplastie untersucht werden. Diese sollte mit der Wirkung von scrambled-Oligonukleotiden verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 28 männliche, Weiße Neuseelandkaninchen (New Zealand White Rabbits; Charles River; Kißlegg). Die Tiere wogen zwischen 2,5 und 3 kg und wurden in Einzelkäfigen gehalten. Der natürliche Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere wurde mit Hilfe von künstlichem Licht imitiert. Nach der Lieferung wurden die Tiere zur Akklimatisation zwei Wochen im Stall gehalten.

Die Tiere wurden insgesamt dreimal operiert. Die erste Operation erfolgte zwei Wochen nach der Anlieferung. Nach weiteren vier Wochen folgte die zweite, darauffolgend nach sechs Wochen die dritte Operation.

Während des gesamten Zeitraums bekamen die Tiere Wasser und Futter ad libitum. Eine Woche vor der ersten Operation wurde das Futter auf eine 1 %-cholesterinhaltige Kost umgestellt. Diese Diät wurde über neun Wochen beibehalten, bevor zwei Wochen vor der letzten Operation wieder Normalkost gegeben wurde.

Die 28 Versuchstiere wurden 2 Gruppen zugeordnet. Gruppe 1 bestand aus 17 Tieren, Gruppe 2 aus 11 Tieren. Beide Gruppen erhielten dieselbe Therapie. Sie unterschieden sich jedoch in der Höhe der applizierten NF- κ B-Dosis. In der ersten Gruppe wurde 1 μ g NF- κ B appliziert, in der zweiten 10 μ g.

Der Versuch wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt. (AZ: II 25.3 – 19c 20-15/1 – MR 20/24-25/99).

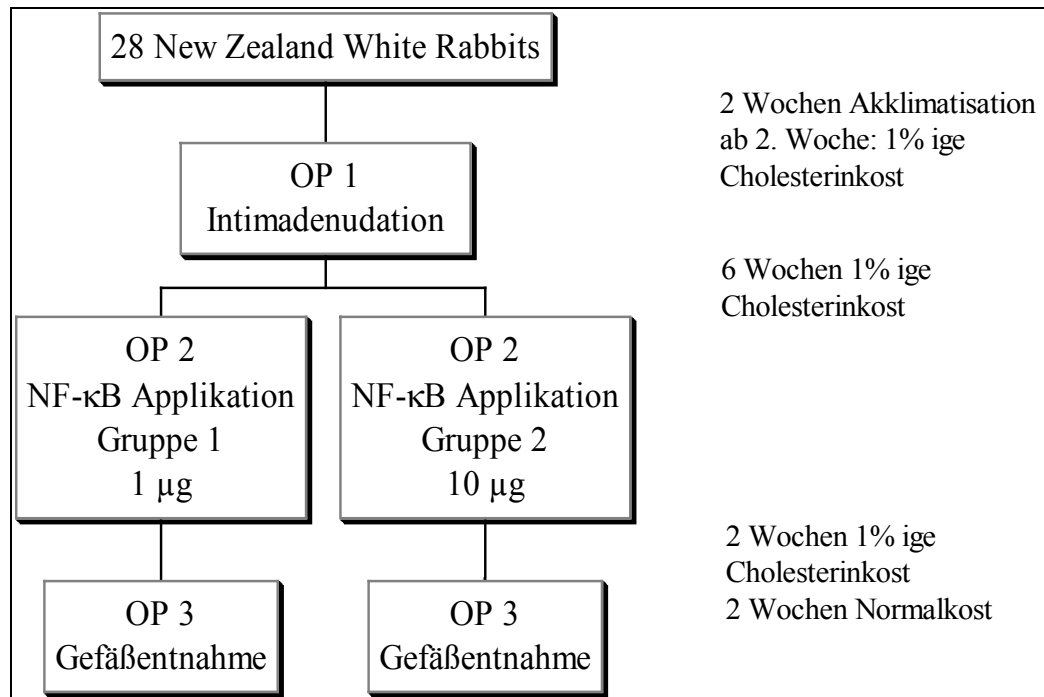


Abb. 10: Versuchsaufbau

2.2 Oligonukleotide

Bei der zweiten Operation erfolgte die lokale Pharmakotherapie mit Oligonukleotiden (ODN; MWG-Biotechniques; Martinsried; Germany). Es wurden folgende Sequenzen verwendet:

Decoy-ODN:

5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

3'-TCAACTCCCCTGAAAAGGGTCC-5'

Scrambled ODN:

5'-TTGCCGTACCTGACTTAGCC-3'

3'-AACGGCATGGACTGAATCGG-5'

Vor der Verwendung der ODN wurden die ODN zur Hybridisierung eine Stunde bei Raumtemperatur belassen.

Als Vektor für das DNA-Material wurde Tfx-50, ein Reagenz aus einem kationischen Lipid und DOPE verwendet ([N,N,N',N'-tetramethyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3,-di(oleoyloxy)-1,4-butanediammonium iodide] und L-dioleoyl

phosphatidylethanolamin, DOPE; Promega; Mannheim). Der Lipidanteil besteht aus einer positiv geladenen Kopfgruppe, welche über eine Esterbindung mit einem Lipidgerüst verbunden ist. Die positiv geladene Kopfgruppe tritt mit der negativ geladenen Nukleinsäure unter Bildung eines Vesikels in Wechselwirkung. Das Ladungsverhältnis der positiven Kopfgruppen zu den negativen Phosphatgruppen der DNA betrug 4:1. Für Versuchsgruppe 1 wurde 1 µg ODN, für Versuchsgruppe 2 wurden 10 µg ODN in 2 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung gelöst. 60 µl Tfx-50 wurden hinzu pipettiert, und die Lösung inkubiert bei Raumtemperatur 15 min. Sofort nach Inkubationszeit wurde die Lösung verwendet. Die Kontrolllösung mit den scrambled-ODN wurde analog hergestellt.

2.3 Medikamente

Zur Narkosierung und Analgesierung wurde den Tieren initial eine Kombination aus Ketamin (Ketamin 500 Hexal®, Hexal; Holzkirchen) und Rompun (Rompun® 2%, Bayer; Leverkusen) intramuskulär in die Glutealmuskulatur gespritzt. Das Verhältnis von Ketamin zu Rompun war 7:3, die Dosis betrug 1,5-2 ml. Ketamin ist ein Injektionsnarkotikum mit hypnotischer und stark analgetischer Wirkung, welches für Kurznarkosen verwendet wird. Bei Rompun (Wirkstoff Xylazin) handelt es sich um ein Sedativum, Analgetikum, Anästhetikum und Muskelrelaxans, welches für veterinärmedizinische Eingriffe verwendet wird. Zur intraoperativen Aufrechterhaltung der Narkose wurden über einen intravenösen Zugang in der Ohrvene bei Bedarf 0,1-0,2 ml Ketamin nachinjiziert.

Zur Prophylaxe thromboembolischer Komplikationen wurden zu Beginn jeder Operation 100 IU/kg Körpergewicht Heparin (Liquemin® N 5000; Hoffmann-La Roche AG) i.v. gegeben.

Zur Abtötung der Tiere in der dritten Operation wurden 2 ml T61 (Hoechst Roussel Vet; Hoechst; Frankfurt; Germany) i.v. gespritzt. T 61 setzt sich zusammen aus Embutramid, Mebezoniumjodid und Tetracainhydrochlorid im Verhältnis 40:10:1.

2.4 Kathetermaterial

Um Kathetermaterial intravasal einzubringen, wurde in Seldinger-Technik eine 4 French-Schleuse (Terumo Corporation; Tokyo; Japan) eingeführt.

Der für die Gefäßmessung verwendete Führungsdraht (GraduateTM Führungsdraht zur Gefäßmessung MG 35-180- Grad; Cook® William Cook Europe; Bjaeverskov) hat distal sechs Markierungen im Abstand von einem Zentimeter, proximal vier Markierungen in fünf Zentimeter Abständen.

Als Führungsdraht für den Ballonkatheter zur Intimadenudation wurde der SCIMED V-18 Control WireTM Führungsdraht benutzt (Boston Scientific Corporation; Massachusetts; USA). Er ist mit ICMTM hydrophil beschichtet und hat einen Nenndurchmesser von 0,46 mm.

Die Ballondenudation wurde mit einem 2 cm langen, 3 mm durchmessenden Ballonkatheter (Viper; Boston Scientific; Watertown; MA; USA) gemacht.

Als Führungsdraht für den channeled-balloon Katheter diente der ACS Hi-Torque Intermediate® Guide Wire (Guidant Temecula; CA; USA) mit Hydrocoat® hydrophiler Beschichtung, einer Länge von 190 cm und einem Durchmesser von 0,014 inches.

Der channeled-balloon Katheter (Boston Scientific Corporation; Watertown; MA; USA) wurde in Abschnitt 1.7 ausführlich beschrieben. Der Katheter wurde in dem Versuch zur lokalen Pharmakotherapie mit den Oligonukleotiden verwendet. Der Schaft des Katheters ist 3,4 French. Der Ballon ist 20 mm lang und hat einen Durchmesser von 2,5 mm. Die Inflation des Ballons wurde mittels eines Manometers (Encore; Boston Scientific; Watertown; MA; USA) kontrolliert. Auch die Medikamentenapplikation erfolgte durch ein solches Manometer.

2.5 Vorversuche

2.5.1 In vitro-Vorversuche

Zusätzlich zum *in vivo*-Hauptversuch mit NF- κ B wurden *in vitro*- und *ex vivo*-Vorversuche gemacht.

In *in vitro*-Versuchen wurden je 8000 VSMC von Kaninchen (rVSMC) mit antisense-ODN und scrambled-ODN mit Hilfe eines liposomalen Carriers, dem Tfx-50, transfiziert. Zunächst wurden vaskuläre glatte Muskelzellen von Weißen Neuseelandkaninchen gewonnen und kultiviert. Die gewonnenen Zellen wurden in Nährböden mit 96 Vertiefungen mit einer Verteilung von 8000 Zellen pro Vertiefung pipettiert.

Zur Quantifizierung der Zellkonzentration wurde ein Standard-MTT-Test durchgeführt. Die Zellen wurden den Versuchsgruppen 1 bis 6 zugeordnet. Mit der Gruppe 1 wurde der Leerwert bestimmt. In den Gruppen 2 und 3 erfolgte die ODN-Transfektion. Zur Herstellung des Transfektionsreagenz wurden für diese beiden Gruppen, wie auch für den Hauptversuch beschrieben, 60 μ l Tfx-50 als liposomaler Vektor und 100 ng ODN gemischt. Als Oligonukleotid in Gruppe 2 wurde NF- κ B in einer Menge von 100 ng verwendet und in Gruppe 3 scrambled-ODN, ebenfalls in der Menge von 100 ng. Die Gruppen 4 bis 6 dienten zur Kontrolle und zum Ausschluss unspezifischer Wirkungen. In Gruppe 4 wurden 60 μ l Tfx-50 ohne Zugaben von DNA appliziert, in den Gruppen 5 und 6 wurden jeweils 100 ng NF- κ B-ODN bzw. 100 ng Scrambled-ODN ohne die Zugabe eines liposomalen Vektors hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, wurden 20 μ l MTT-Lösung zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 2 Stunden der Inkubation wurde die Extinktion bei 540 nm gemessen.

2.5.2 Auswertung der *in vitro*-Versuche

Zu den Zellen der Gruppe 1 wurde kein Reagenz hinzugegeben. In dieser Versuchsgruppe konnte die Proliferation der Zellen ungehemmt ablaufen. Deshalb

wurde anhand dieser Gruppe der Leerwert bestimmt. Per definitionem wurde festgelegt, dass die hier gemessene Extinktion gleich 100 % der Zellzahl entsprechen soll. Daraus folgend konnte anhand der Extinktion in den anderen Gruppe die jeweilige prozentuale Zellzahl berechnet werden.

2.5.3 *Ex vivo*-Versuche

Anhand der *ex vivo*-Versuche sollte untersucht werden, ob unter Verwendung des channelled-balloon Katheters und des liposomalen Vektors Tfx-50 eine effiziente Applikation der Oligonukleotide und eine Transfektion der Zielzellen möglich ist. Für diese Versuche wurden zunächst *ex vivo*-Segmente aus der Aorta des Weißen Neuseelandkaninchens entnommen. Ein Transfektionsreagenz bestehend aus 1 µg Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden (MWG Biotech, München) und 60 µl Tfx-50 wurde hergestellt. 1 ml dieser Lösung wurde dann mit Hilfe des channelled-balloon Katheters bei einem Druck von 2 atm in die Aortensegmente appliziert. Die Segmente wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

2.6 Hauptversuche

2.6.1 Intervention 1 – Intimadenudation

Nach erfolgter Allgemeinanästhesie (1,5–2,0 ml Ketamin und Rompun, i. m. in den Glutealbereich) wurde den Versuchstieren die Regio cervicalis anterior und die Regiones sternocleidomastoideae und zusätzlich an der postero-kaudalen Seite des Ohrs das Gebiet über der dort verlaufenden Vene rasiert. In diese Vene wurde ein Zugang gelegt, durch welchen präoperativ 1 ml Heparin gespritzt und bei Bedarf intraoperativ Ketamin nachinjiziert wurde. Das Versuchstier wurde in Rückenlage mit abduzierten und außenrotierten Extremitäten auf dem Angiographietisch festgebunden. Zur Fixierung dienten Gummischläuche, welche mit Kompressen unterpolstert wurden. Der Kopf wurde dorsalflektiert, wobei eine Mullbinde unter dem Nacken half, den Hals überstreckt zu halten. Über eine Sauerstoffmaske wurden 2 l O₂/min gegeben. Der freirasierte Hals wurde mit Kodanspray desinfiziert und das Tier mit einem sterilen Angiographietuch abgedeckt.

Bei der ersten Operation wurde nach einem Hautschnitt links des Trachealknorpels die A. carotis communis sinistra freipräpariert und diese proximal und distal der präparierten Stelle mit Mersilene 2/0 (Ethicon®; Johnson&Johnson) umschlungen. Distal wurde das Gefäß mit Prolene 4/0 (Ethicon®; Johnson&Johnson) ligiert. Eine 4 French-Schleuse wurde retrograd in Seldinger-Technik in die Arterie eingebracht. Ein Kalibrationskatheter wurde in die Aorta abdominalis vorgeschoben, welcher später zur angiographischen Auswertung der Bilder diente. Es erfolgte nun eine Angiographie, um die Ausgangssituation der Gefäße zu dokumentieren. Nach Entfernen des Kalibrationskatheters wurde nacheinander in beide Aa. iliacae externae ein Ballonkatheter platziert. Nach Inflation des Katheters wurde dieser dreimal um je etwa 1 cm vor und zurück bewegt, um die Gefäßwand in diesem Bereich zu denudieren, d.h. zu deendothelialisieren. Vor Entfernung von Katheter, Draht und Schleuse erfolgte eine Abschlußangiographie. Dabei sah man häufig distal des Denudationsortes einen Vasospasmus der Iliakalgefäße. Proximal der Punktionsstelle der A. carotis communis wurden mit Prolene zwei Ligaturen gemacht und anschließend sowohl Faszie als auch Haut mit Mersilene genäht.

2.6.2 Intervention 2 – Lokale Applikation von NF-κB

Sowohl die Anästhesie als auch die Vorbereitung der Tiere wurden wie unter Operation 1 beschrieben durchgeführt. Der Hautschnitt erfolgte diesmal rechts des Trachealknorpels und es wurde die rechte A. carotis communis punktiert. NF-κB bzw. scrambled-DNA wurde mit Tfx-50 gemischt. Um die Narkosedauer möglichst gering zu halten, wurde die Mischung intraoperativ schon vor Punktionsbeginn angesetzt. Die Inkubationszeit von 15 min musste exakt eingehalten werden. Deshalb wurde in der zweiten Operation bewusst die rechte Seite als Punktionsseite gewählt, da die Sondierung des Aortenbogens aus der rechten A. carotis durch den günstigeren Winkel beider Gefäße zueinander bedingt einfacher ist und innerhalb der Inkubationszeit durchgeführt werden konnte.

Zur Abschätzung des Stenosegrades wurde eine kalibrierte multidirektionale Angiographie gemacht (a.-p., 30° LAO, 30° RAO). Es wurde darauffolgend durch den Kobrakatheter der Führungsdraht für den channeled-balloon Katheter in die Iliakalarterie vorgeschoben. Durch Randomisierung war präoperativ die jeweilige

Applikationsseite für NF- κ B festgelegt worden. Der channeled-balloon Katheter wurde platziert und es wurde je ein Druckmanometer an den Port für die Medikamentenapplikation und an den für die Ballondilatation angeschlossen. Für die Dilatation wurde der Ballon über das mit NaCl-Lösung gefüllte Manometer bis auf 8 atm inflatiert. In dem anderen Druckmanometer wurde die angesetzte Mischung bis auf insgesamt 2 ml mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgezogen und über den Ballon bei 2 atm lokal appliziert. Um das Totvolumen des Schlauchs zu entleeren, wurden noch einmal mit 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung nachgespült. Auf der kontralateralen Seite erfolgte dasselbe mit den scrambled-ODN. Nach der Abschlußangiographie wurde das Kathetermaterial entfernt, die Arterie zweimal ligiert und der Operationssitus vernäht.

2.6.3 Intervention 3 – Gefäßentnahme

Bei der dritten Operation wurde, da nun durch die zwei ligierten Karotiden kein leicht freizupräparierender Zugang mehr vorhanden war, eine intravenöse Angiographie über einen Zugang in der Ohrvene gemacht. Anstelle des Kalibrationskatheters wurde ein Lineal unter das Tier gelegt, was trotz des Verzerrungsfaktors keine deutlichen Abweichungen von der intravasalen Messung zeigte. Ebenfalls intravenös wurden 2 ml T61 gespritzt und das Tier so abgetötet. Der Bauchsitus wurde mit einer Schere eröffnet, Aorta abdominalis und Aa. iliacae externae im Retroperitoneum freipräpariert und im Paket entnommen. Die Gefäße wurden von umgebendem Bindegewebe befreit. Aus dem Gefäßpräparat wurde 1 cm proximal der Aortenbifurkation, aus der Aorta abdominalis, und 2 cm distal davon, entlang des Verlaufs der Aa. iliacae communes et externae, ein Gefäßsegment herausgeschnitten. Die beiden Seiten wurden markiert, das Präparat anschließend mit 0,9%iger NaCl-Lösung durchgespült und dann in 4%igem Paraformaldehyd immersionsfixiert.

2.7 Gefäßpräparate

2.7.1 Einbettung und Schneiden

Um einen möglichst großen Teil des denudierten Bereichs der Iliakalarterie auswerten zu können, wurde die jeweilige Seite der Arterie in drei etwa 0,3 mm lange Stücke geschnitten und in Biopsiekassetten gelegt. Vor der Einbettung in Paraffin mussten die Präparate zunächst entwässert werden. Um dabei eine zu starke Schrumpfung oder Zerreißung des Präparats zu vermeiden, erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70-100%igem Alkohol. Zur vollständigen Beseitigung des Alkohols wurden die Präparate aus absolutem Alkohol in Methylbenzoat (Fa. Merck; Darmstadt) und Rotihistol (Fa. Roth; Karlsruhe) übertragen. Die anschließende Einbettung erfolgte in Paraffin (Fa. Sherwood; St. Louis; USA).

Mit einem Mikrotom wurden von jedem der drei eingebetteten Gefäßsegmente 4 µm dicke Schnitte gemacht und diese auf einen Objektträger gebracht.

2.7.2 Färbung

Die Präparate wurden mit Hämalun und Eosin gefärbt. Zuvor musste das Paraffin mit Xylol gelöst und die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100-70%) entwässert werden. Darauffolgend kamen die Schnitte für 5 min in Mayers Hämalunlösung (Diagnostica Merck; Darmstadt) bis die Kerne gut gefärbt waren. Anschließend verblieben sie nach gründlichem Ausspülen unter fließendem Leitungswasser weitere 5 min zur Gegenfärbung in Eosin B (Certistain Eosin B; Diagnostika Merck; Darmstadt). Der Überschuss des Farbstoffes wurde unter fließendem Wasser ausgewaschen. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und der absolute Alkohol wurde durch Xylol entfernt. Zuletzt wurden die angefärbten Schnitte zur Konservierung in Kanadabalsam (Fa. Roth; Karlsruhe) eingeschlossen.

2.7.3 Morphometrische Auswertung

Die morphometrische Auswertung der H.-E. gefärbten Präparate wurde mit Hilfe eines semiautomatischen planimetrischen Systems durchgeführt. Die Schnitte wurden auf einen digitalen Image Analyzer (Leica; Germany; Software: Quantimed 600) projiziert und ausgewertet.

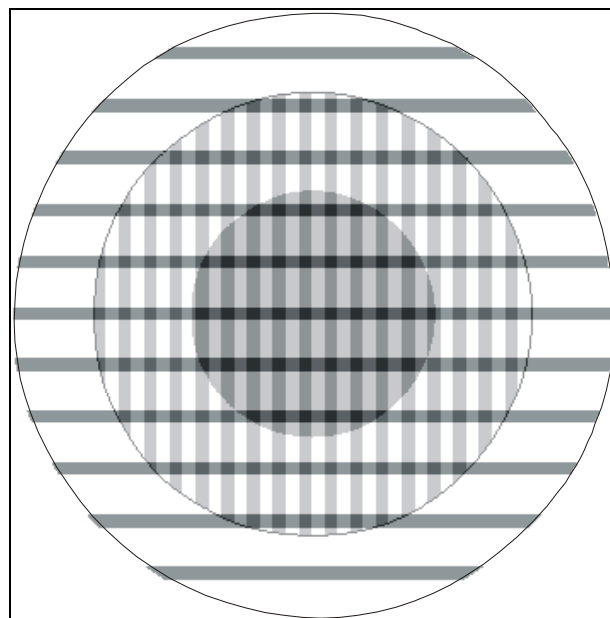
Mit dem Cursor können unterschiedliche Flächen markiert und mit Hilfe des Programms berechnet werden. Es wurden folgende Flächen bestimmt:

- Fläche des Lumens,
- Fläche unter der Lamina elastica interna (LEI) und die
- Fläche unter der Lamina elastica externa (LEE).

Daraus folgt für die Berechnung von Neointima und Media:

- Neointima = Fläche unter LEI minus Lumen,
- Media = Fläche unter LEE minus Fläche unter LEI

Jeder Schnitt wurde zweimal gemessen, wobei nur die Gefäße mit der größten Neointimafläche in der späteren Auswertung berücksichtigt wurden.



■ Lumen, ■ Fläche unter LEI,
■ Fläche unter LEE

Abb. 11: Morphometrische Auswertung

Ein weiterer Parameter, der anhand der morphometrischen Daten berechnet wurde, ist das Intima/Media-Verhältnis (I/M-Ratio):

- $$\text{I/M-Ratio} = \frac{\text{Neointima}}{\text{Media}} \times 100 [\%]$$

2.8 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Ergebnisse wurden mittels eines statistischen Kalkulationsprogramms ausgewertet (SPSS for Unix; Release 6.14). Nach der Bestätigung der Normalverteilung der *in vitro* Daten im Kolmogoroff-Smirnoff-Test wurden diese mittels des students t-Test verglichen. Die *in vivo* Daten wurden durch eine Einweg-Varianzanalyse verglichen (ANOVA) und durch Fishers t-Test wurden weitere Unterschiede zweier Mittelwerte evaluiert. Ein prädiktiver Wert (p) $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Vorversuche

Die Messung der Extinktion im MTT assay bei 540 nm lieferte für die Kontrollgruppe mit 0,47 die höchsten Werte und gleichzeitig den Leerwert für die anderen Gruppen. Der für die Kontrollgruppe gemessene Wert der Extinktion bei 540 nm ist ein Messwert für die Zellzahl in dieser Gruppe. Die Zellmenge wurde anhand dieses Wertes als 100% definiert. Entsprechend der gemessenen Extinktion in den anderen Gruppen wurde die jeweilige Zellmenge berechnet. Bei der Verwendung von NF- κ B-Oligonukleotiden und Tfx-50 konnte der niedrigste Wert mit 0,228 gemessen werden, was den Wert der Kontrollgruppe mehr als halbierte. D.h. hier konnten wir eine Proliferationshemmung nachweisen, wobei der Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch signifikant war ($p < 0,05$ im t-Test). Die scrambled-ODN und Tfx-50 zeigten eine Extinktion von 0,307. Die Gruppen, in denen jeweils Tfx-50, NF- κ B- und scrambled-Oligonukleotide alleine verwendet wurden, zeigten, abgesehen von der Kontrollgruppe, die höchsten Extinktionswerte mit 0,454 für Tfx-50, 0,362 für NF- κ B-ODN und 0,375 für scrambled-ODN. Die gemessenen Unterschiede waren nicht signifikant.

In Abbildung 12 werden die Extinktionswerte der Versuchsgruppen bei 540 nm dargestellt.

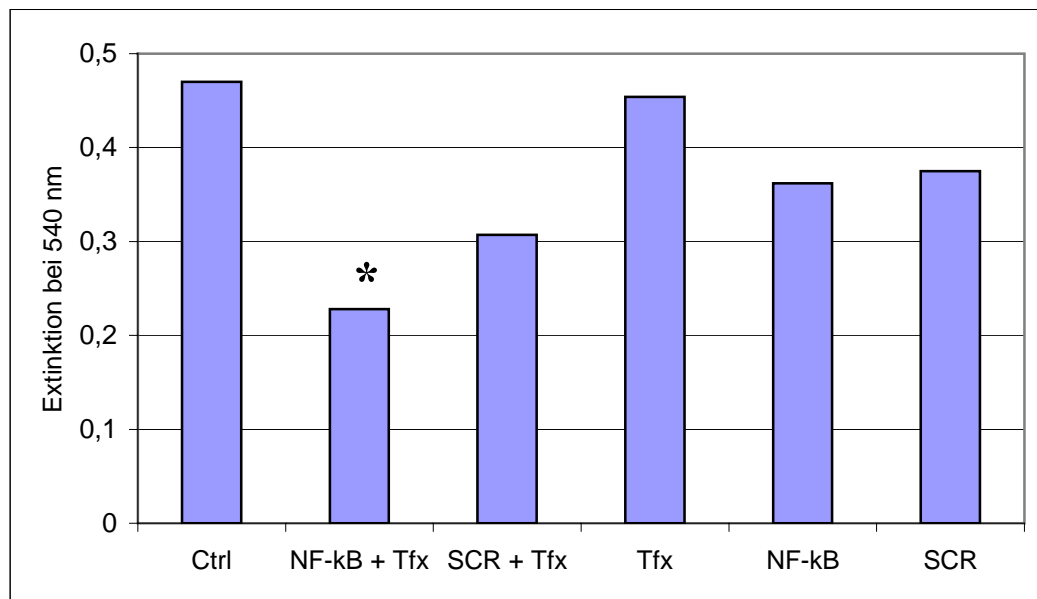


Abb. 12: Vergleich der Extinktionswerte der *in vitro*-Vorversuche, * statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$ im t-Test)

Berechnet man wie oben erwähnt anhand der Extinktionswerte die Zellmenge, erhält man folgende Ergebnisse. In der Gruppe 2 mit Applikation von NF-κB und Tfx-50 war die Zellmenge mit 49% am geringsten. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe war dies eine statistisch signifikante Reduktion der Zellmenge ($p < 0,05$). Die Reduktion der Zellmenge der mit den scrambled-ODN transfizierten Zellen auf 65% war nicht signifikant. Die alleinige Transfektion der Zellen mit Oligonukleotiden ergab eine Zellmenge von 77% für NF-κB und 80% für Scrambled. Die Zellmenge in der Gruppe 4, in der lediglich Tfx-50 appliziert worden war, betrug 97% der Kontrollgruppe.

In den *in vitro*-Vorversuchen konnte also eine sequenz-spezifische Hemmung der Proliferation der rVSMC durch die NF-κB-ODN nachgewiesen werden.

Die Abbildung 13 vergleicht die Zellmenge der Versuchsgruppen bezogen auf die Kontrollgruppe.

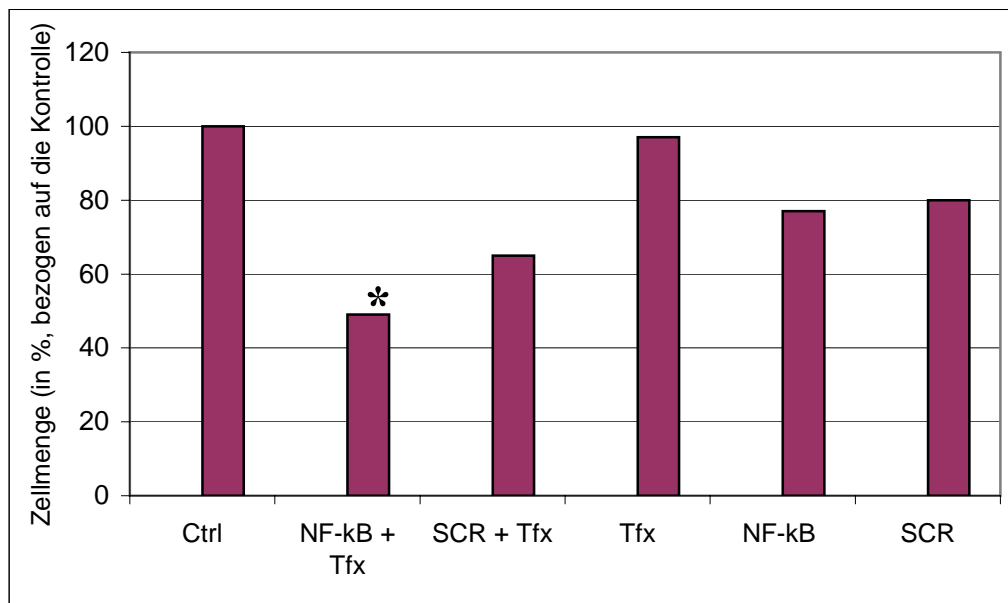


Abb. 13: Vergleich der Zellmenge der *in vitro*-Vorversuche
 * statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$)

3.2 Versuchstiere

Insgesamt nahmen 28 Versuchstiere an der Studie teil. Davon erreichten 24 Tiere das Versuchsende. In Gruppe 1 mit ursprünglich 17 Tieren waren dies 15 Tiere. In Gruppe 2 verblieben von 11 Tieren 9 Tiere. Zur Auswertung kamen letztendlich 22 Tiere, da in beiden Versuchsgruppen noch je ein Präparat fixationsbedingte Artefakte aufwies, was eine morphometrische Auswertung nicht zuließ.

Die Abbildung 20 gibt den Verlauf des Versuchs hinsichtlich der verstorbenen Versuchstiere und der auswertbaren Präparate wieder.

Bei den vier verstorbenen Tieren kam es bei zwei Tieren bei Einführung der Schleuse in der ersten Operation zu einer Ruptur der A. carotis externa. Beide Tiere wurden durch eine letale Dosis T61® abgetötet. Die Todesursache bei zwei weiteren Tieren ist nicht genau bekannt. Die Kaninchen verstarben jeweils zwischen der zweiten und dritten Operation. Bei beiden fiel ein starker Sklerenikterus auf. Zudem kam es bei einem der Tiere im Bereich der Hinterläufe zu Blutungskomplikationen, für deren Ursache keine Erklärung gefunden werden konnte. Bei der postmortalen Obduktion zeigte sich bei beiden Tieren eine

Lebervergroößerung und ein massiver Aszites, so dass hier von einem Leberversagen ausgegangen werden muss. Da beide Tiere den unterschiedlichen Versuchsgruppen entstammten, kann kein möglicher Zusammenhang zur NF- κ B Dosis gebildet werden.

Trotzdem im Verlauf des Versuchs beide Carotiden ligiert wurden, zeigte keines der Tiere neurologische Auffälligkeiten.

Es bestand ein unterschiedlich hoher präoperativer und intraoperativer Bedarf an Narkosemittel. Teilweise mussten bis zu 2 ml (=10 mg) Ketamin intraoperativ nachinjiziert werden.

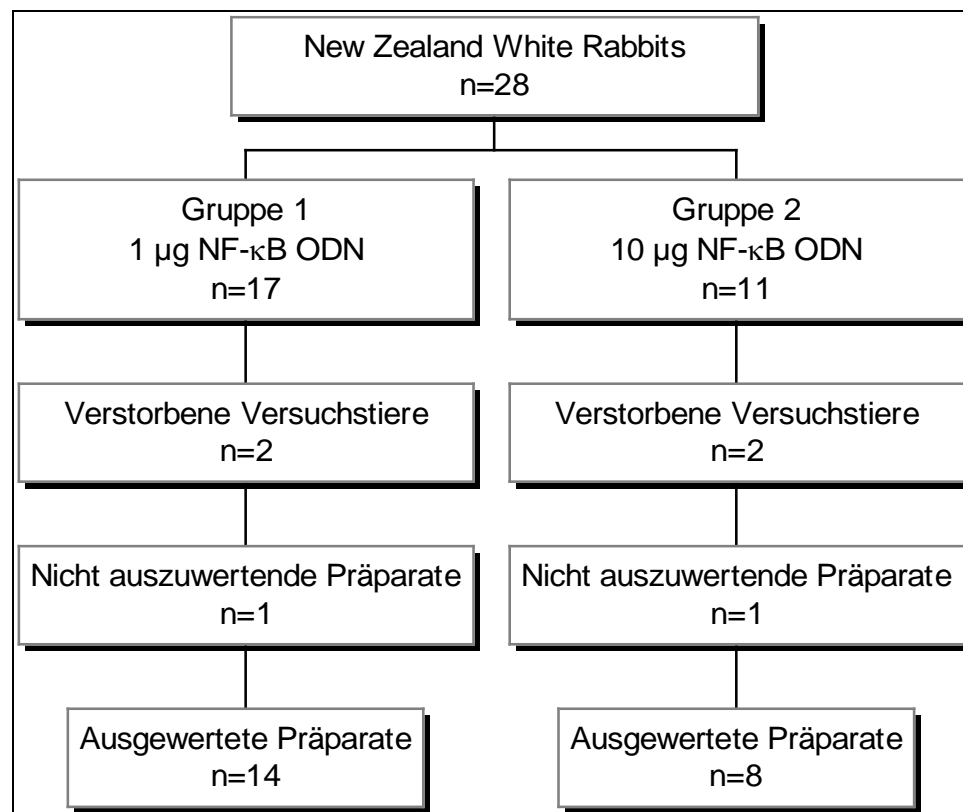


Abb. 14: Auswertung der Versuchstiere und der Präparate

3.3 Angiographische Auswertung

Die durch die digitale Subtraktionsangiographie gewonnenen Bilder wurden zur angiographischen Auswertung herangezogen. Es wurden nur die Bilder ausgewertet, die zu Beginn der jeweiligen Operationen gemacht wurden, also den Ausgangszustand des Gefäßes vor der Intervention zeigten.

Die Abbildungen 15 bis 17 zeigen die vor den jeweiligen Operationen gemachten Angiographien.

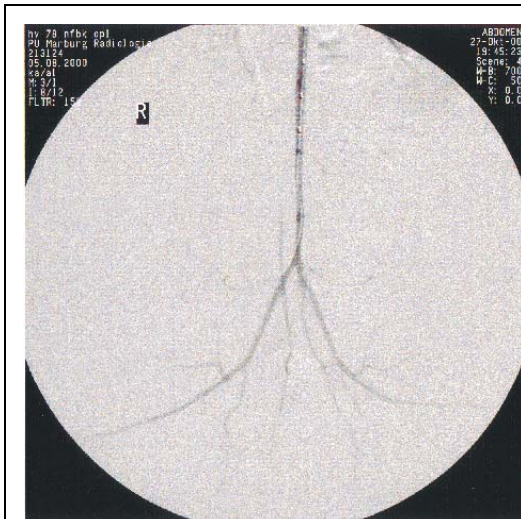


Abb. 15: Angiographische Darstellung des Gefäßzustands vor Operation 1

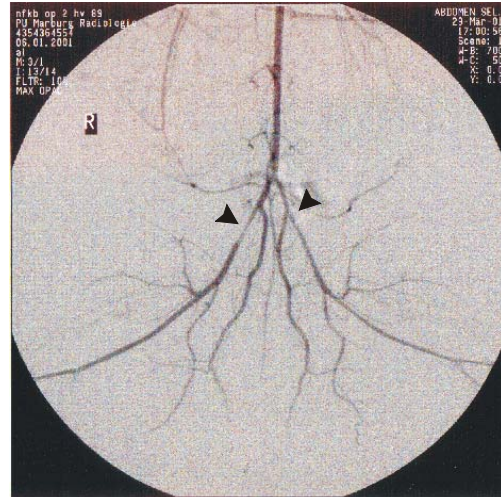


Abb. 16: Angiographie vor Operation 2. Die Pfeile zeigen auf Stenosen in beiden Aa. iliacae externae

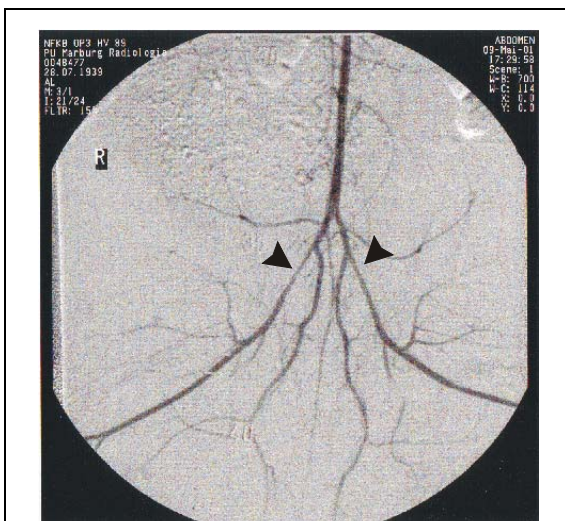


Abb. 17: Angiographie vor Operation 3. Die Pfeile zeigen auf Stenosen in beiden Aa. iliacae externae

Beim Vergleich der kleinsten Durchmesser der Gruppen vor der ersten Operation fielen kaum Unterschiede auf. In der Gruppe 2 betrug der kleinste Gefäßdurchmesser sowohl auf der Kontroll- als auch auf der Applikationsseite 2,0 mm.

Auch auf der Kontrollseite der Gruppe 1 maß im nativen Zustand der Durchmesser 2,0 mm. Auf der Applikationsseite war der Durchmesser mit 1,95 mm etwas geringer.

Die weiteren morphometrischen Analysen in der Angiographie ergaben, dass durch das initiale Ballondenudationstrauma eine Stenose induziert werden konnte.

Im einzelnen ergab sich eine Reduktion des Durchmessers mit 1,38 mm auf 71% des Ausgangsdurchmessers in der Gruppe 1. Auf der Kontrollseite war eine Abnahme des Querschnitts um 79% auf 1,58 mm zu messen. In Gruppe 2 veränderten sich die Gefäßdurchmesser in geringerem Maße. Hier betrug die Kontrollseite 1,83 mm, was eine Verringerung von 92% im Vergleich zum Ausgangswert darstellte. Auf der Seite der Applikation stenosierte das Gefäß auf 1,93 mm und damit auf 97% der ursprünglichen Weite.

Dieser Vergleich bestätigt das Stenosemodell. Es wird ersichtlich, dass im Verlauf der Zeit zwischen der ersten Operation mit der Stenoseinduktion durch die Deendothelialisierung und der zweiten Operation eine allgemeine Tendenz zur Stenosierung vorlag.

Vergleicht man nun weiter die Ergebnisse der zweiten Operation mit denen der dritten, stellt man eine Zunahme des Gefäßdurchmessers fest. In der Gruppe 1 war auf der Applikationsseite die stärkste Vergrößerung des Durchmessers mit 35% auf 1,86 mm im Vergleich zum Wert aus der Operation 2 zu messen. Die Steigerung des Durchmessers auf 1,65 mm auf der Kontrollseite betrug lediglich 4,7%. In Gruppe 2 konnte für die Applikationsseite keine Zunahme des Durchmessers gemessen werden. Auf der Kontrollseite der Gruppe 2 steigerte sich der Durchmesser von 1,83 mm auf 2,07 mm um etwa 12% und überschritt hier sogar den Nativwert vor der ersten Operation.

Die Abbildung 18 stellt die Werte der angiographischen Auswertung gegenüber.

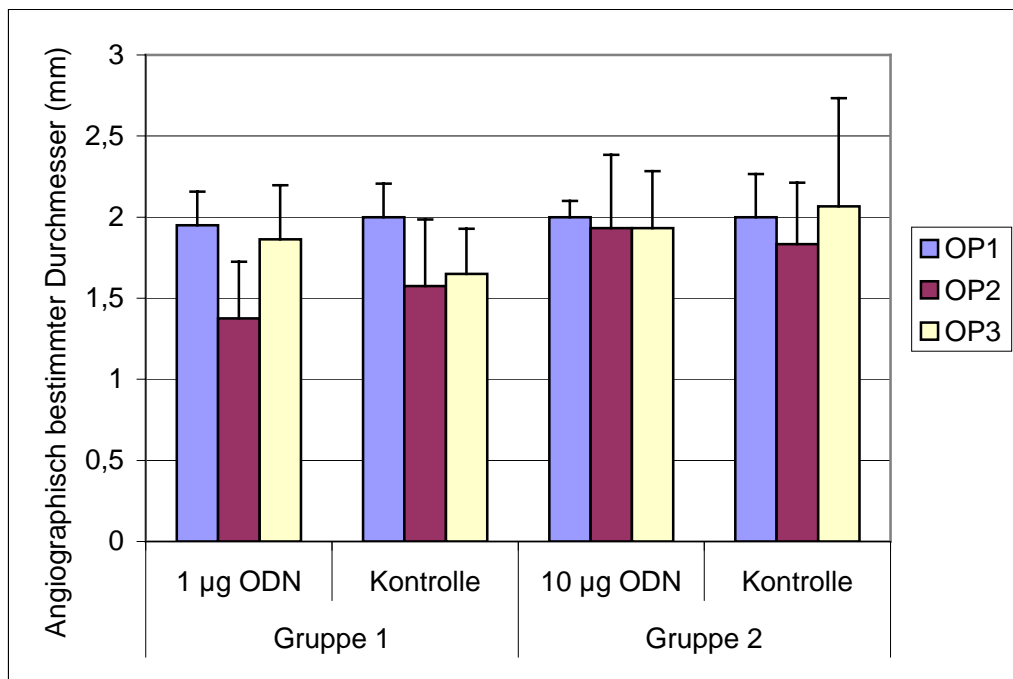


Abb. 18: Vergleich des angiographisch bestimmten Durchmessers (in mm) jeweils vor OP 1, OP 2 und OP 3 (Angaben als Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.4 Morphometrische Daten

3.4.1 Fläche des Lumens

In der Gruppe 1 betrug die Größe des Lumens in der mit 1 µg NF-κB-Oligonukleotiden behandelten Gruppe $0,374 \pm 0,234 \text{ mm}^2$. Auf der Kontrollseite, auf der scrambled-ODN appliziert worden waren, war das Lumen mit $0,401 \pm 0,151 \text{ mm}^2$ nicht signifikant größer. Auch in der Gruppe 2 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit NF-κB- und der mit scrambled-ODN behandelten Gefäßen. Hier hatte das Lumen auf der Seite des Verums eine Größe von $0,365 \pm 0,227 \text{ mm}^2$. Die Kontrollseite hatte mit $0,344 \pm 0,217 \text{ mm}^2$ insgesamt das kleinste Lumen. Auch der Vergleich der mit NF-κB-ODN behandelten Gefäße der Gruppe 1 und der Gruppe 2 untereinander erbrachte keine signifikanten Ergebnisse. In Abbildung 19 wird die Lumenfläche der einzelnen Versuchsgruppe verglichen.

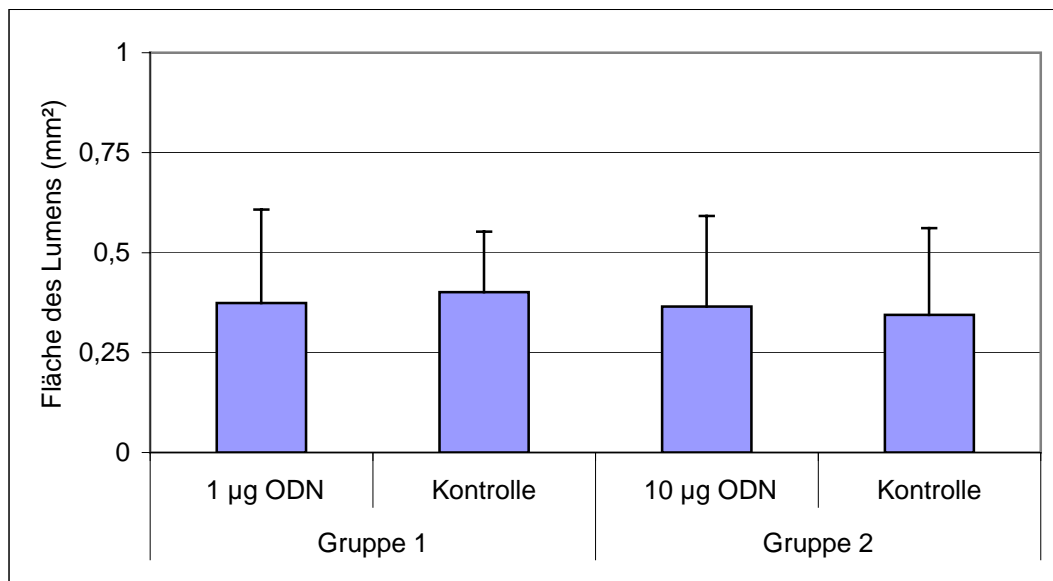


Abb. 19: Vergleich der morphometrisch bestimmten Lumenflächen (in mm²) vier Wochen nach Applikation von NF-κB Oligonukleotiden (Angaben als Mittelwert ± Standardabweichung)

3.4.2 Neointimafläche

In allen histologischen Präparaten zeigte sich eine Neointimabildung.

In der Gruppe 1 mit Applikation von 1 µg NF-κB-ODN betrug die Neointimafläche $0,974 \pm 0,943$ mm². Die Kontrollgruppe der Gruppe 1 mit Applikation von Scrambled-ODN wies eine Neointimafläche von $0,979 \pm 0,908$ mm² auf. Die Fläche der Neointima in der Gruppe 2 betrug mit Applikation der höheren Dosis von 10 µg NF-κB-ODN $0,973 \pm 0,776$ mm² und war damit etwas kleiner als die Fläche der Kontrollgruppe mit $1,033 \pm 0,804$ mm². Zwischen den einzelnen Gruppen konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden ($p > 0,05$ im t-Test).

In der Abbildung 20 wird die Neointimafläche der Versuchsgruppen vier Wochen nach Applikation von NF-κB- bzw. scrambled-ODN dargestellt.

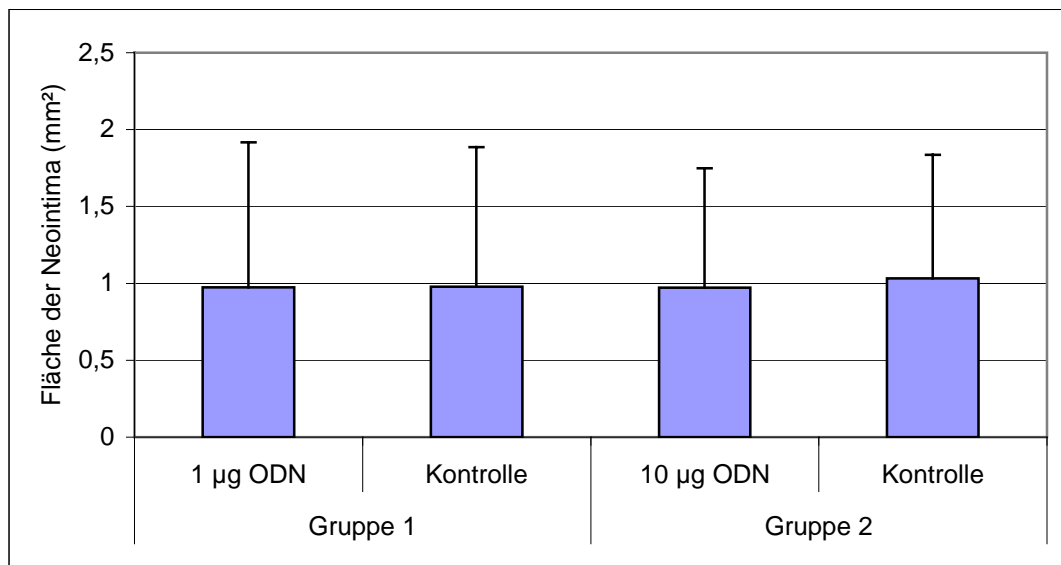


Abb. 20: Vergleich der morphometrisch bestimmten Neointimafläche (in mm²) vier Wochen nach Applikation von NF-κB-Oligonukleotiden (Angaben als Mittelwert ± Standardabweichung)

3.4.3 Intima/Media-Verhältnis

In der Gruppe 2 mit Applikation von 10 µg NF-κB-ODN war dieses Verhältnis mit $150 \pm 114 \%$ am größten. Das Verhältnis der Neointima zur Media war auf der Kontrollseite der Gruppe 2 etwas kleiner und lag bei $143 \pm 128 \%$. In der Gruppe 1 lag das Intima/Media-Verhältnis für die Kontrollgruppe mit scrambled-ODN bei $134 \pm 127 \%$. Das kleinste Verhältnis mit $118 \pm 90 \%$ wurde für die Gruppe mit der Applikation von 1 µg NF-κB-ODN berechnet. Vergleicht man die Intima/Media-Verhältnisse miteinander, kann man keinen signifikanten Unterschied erkennen. Die Abbildung 21 gibt den Vergleich des Intima/Media-Verhältnisses wieder.

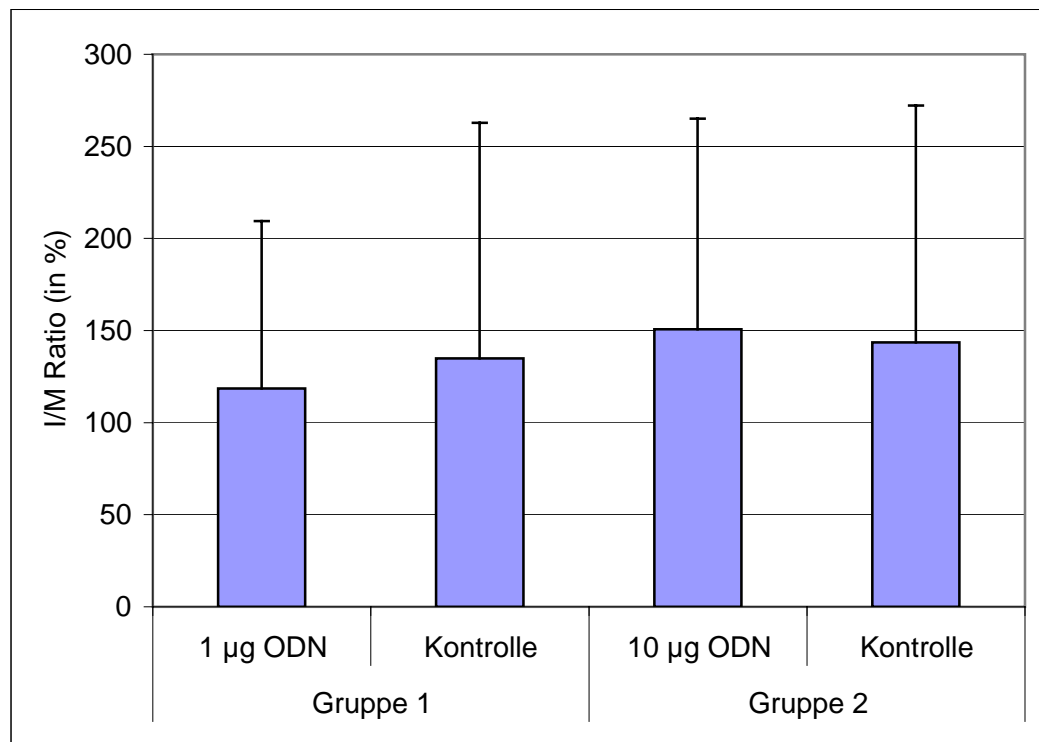


Abb. 21: Vergleich des Intima/Media-Verhältnisses der Versuchsgruppen (Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung)

3.5 Bilder

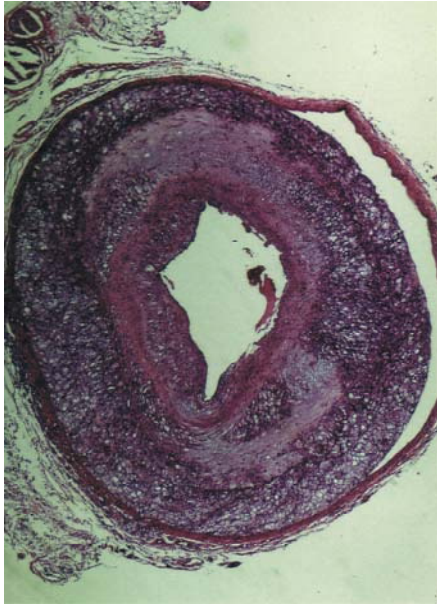


Abb. 22: Histologischer Schnitt einer Arteria iliaca externa nach Stenoseinduktion bei cholesteringefüttertem Kaninchen (H.E.-Färbung)



Abb. 23: Histologischer Schnitt einer Arteria iliaca externa nach Stenoseinduktion bei cholesteringefüttertem Kaninchen (H.E.-Färbung)



Abb. 24: Histologischer Schnitt einer Arteria iliaca externa nach Stenoseinduktion bei cholesteringefüttertem Kaninchen (EvG-Färbung)



Abb. 25: Histologischer Schnitt einer Arteria iliaca externa nach Stenoseinduktion bei cholesteringefüttertem Kaninchen (EvG-Färbung)

4. Diskussion

Unsere Versuchsdaten zeigen einerseits, dass es durch die Anwendung von NF- κ B-Oligonukleotiden *in vitro* möglich ist, die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen zu hemmen. Andererseits konnte diese Wirkung im Kaninchenmodell *in vivo* nicht beobachtet werden.

Die Gründe für das Scheitern unseres Therapieansatzes *in vivo* können an vielen Punkten liegen und werden im folgenden diskutiert.

4.1 Zellkulturen, Tiermodelle und klinische Studien

Immer noch ist das Verständnis der Pathomechanismen der Restenose unvollständig. Um die hohen Restenoseraten durch eine adäquate Therapie senken zu können, müssen weitere Kenntnisse über die Grundlagen der Restenose erlangt werden. Als Studienobjekte bieten sich Zellkulturen, Tierversuche und klinische Studien an.

Die *in vitro*-Versuche mit Zellkulturen haben grundlegende Kenntnisse zur Pathophysiologie der Restenose und der Atherosklerose erbracht. Mit ihnen kann aber das komplexe Zusammenspiel der beteiligten Faktoren, wie es *in vivo* geschieht, nicht vollständig simuliert werden (71).

Auch klinische Studien mit Patienten stoßen an ihre Grenzen. Organisatorisch stellt eine klinische Studie hohe Anforderungen. Man benötigt viele Patienten, die zudem bereit sein müssen, an allen Nachuntersuchungen teilzunehmen. Die Kosten für ein solches Projekt sind sehr hoch, und die Bildung von Kontrollgruppen ist oft nicht möglich. Weiterhin können die Variablen nicht ausreichend kontrolliert werden, und die Läsionen entwickeln sich über einen sehr langen Zeitraum. Auch die grundlegenden pathologischen und morphologischen Aspekte werden nur ungenügend geklärt. Zwar ist es heute möglich, durch die direkte Atherektomie Stücke aus der Gefäßwand zu gewinnen, jedoch ist es, außer postmortal, nicht möglich, komplette Gefäßquerschnitte zu erhalten. Diese wären jedoch für die histopathologische Gesamtbeurteilung eines Gefäßes von Bedeutung.

Auch angiographisch können lediglich Aussagen über die Größe des Lumens gemacht werden. Für genauere Aussagen über die Gefäßwand benötigt man jedoch den Ultraschall oder eine MRT-Untersuchung.

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts werden Tiere als Versuchsobjekte verwendet. Zunächst wurde das Kaninchen als mögliches Atherosklerosemodell beschrieben. Seit den 60er Jahren experimentierte man verstärkt mit Vögeln, Schweinen, Hunden und Primaten, bis man im Laufe des letzten Jahrzehnts zu Forschungen mit Inzuchtstämmen, transgenen Mäusen und Kaninchen überging. Während sich frühe Studien mit der Pathogenese und der Ätiologie der Atherosklerose beschäftigten, wird der Schwerpunkt heutiger Forschung eher auf die Prävention und die Therapie der Komplikationen gelegt, welche sich aus den neuen interventionellen Techniken ergeben (106).

Die daraus folgenden Anforderungen an ein Tiermodell in der Atherosklerose- und Restenoseforschung wurden von Vesselinovitch formuliert:

- Ähnlichkeiten zur humanen Anatomie und Physiologie,
- Reproduzierbarkeit der humanen Gefäßläsionen bezüglich Morphologie, Verteilung und Pathogenese,
- Größe und Kosten des Tiers (141).

Bis heute existiert jedoch kein ideales Tiermodell, das allen Anforderungen gerecht wird (106). Zur Auswahl stehen kleine (Nagetiere, Vögel, Guinea-Schweine, Kaninchen) und große Tiermodelle (Schweine, Hunde, Primaten).

Bei der Verwendung kleiner Tiere stehen die geringen Anschaffungs- und Unterhaltskosten der Tiere, die leichte Handhabung und die geringeren ethischen Bedenken, die sich insbesondere im Vergleich zu Versuchen mit Primaten ergeben, im Vordergrund. Verglichen mit großen Tieren sind die benötigten Medikamentendosen aufgrund des geringeren Körpergewichts der Tiere niedriger und die notwendige Menge an teuren Pharmaka kann reduziert werden. Zudem gibt es Mausmodelle sowohl mit genau definierten genetischen Eigenschaften als auch transgene und knock-out Tiere (71).

Aber auch die Versuche mit großen Tieren bieten einige Vorteile. Die Körpergröße dieser Tiere ermöglicht es, Instrumente zu verwenden, die größtmäßig dem Material entsprechen, das beim Menschen verwendet wird.

Schweine haben darüber hinaus Ähnlichkeiten im Aufbau der Koronararterien und reagieren ähnlich wie Menschen auf Gefäßtraumen. Außerdem können sie Atherosklerose bekommen. Die schwierige Handhabung und die hohen Kosten sind nur zwei der Nachteile bei der Verwendung von großen Tiermodellen.

Die meisten Tiere sind naturgemäß nicht anfällig für Gefäßkrankheiten, die denen der humanen Atherosklerose ähnlich wären. Daraus ergibt sich eines der Hauptprobleme der Tiermodelle. Die Ballonangioplastie beim Menschen wird an atherosklerotisch vorgeschädigten Gefäßen durchgeführt. Diese haben eine andere Physiologie als gesunde Gefäße und reagieren anders auf das durch PTA induzierte Trauma. Dies mag ein Grund dafür sein, dass im Tiermodell vielversprechende Ansätze in klinischen Studien keinen Erfolg zeigten.

Es gibt deshalb die Möglichkeit, im Experiment mit zwei verschiedenen Arten von Tiermodellen zu arbeiten – einem nicht-atherosklerotischem und einem atherosklerotischen Modell (147). Beim nicht-atherosklerotischen Modell wird ein einziges Trauma gesetzt und nachfolgend je nach Versuchsprotokoll eine cholesterinreiche Kost verabreicht wird. Es wird evaluiert, inwiefern in einer vorher normalen Arterie die de novo Bildung einer Neointima stattfindet. Die bei diesem Modell entstehende Läsion zeichnet sich durch ihre Homogenität aus und setzt sich vor allem aus glatten vaskulären Muskelzellen zusammen (147). Jedoch fehlt hier die Komplexität einer atherosklerotischen Läsion. Dies kann womöglich erklären, weshalb die in den Tierversuchen mit nicht-atherosklerotischen Modellen wirkungsvolle Substanzen keine Erfolge in den klinischen Studien verzeichnen konnten. (45, 126, 146, 147).

Beim atherosklerotischen Modell werden in zwei aufeinander folgenden Schritten Traumen ausgelöst. Hier erfolgt zunächst eine Ballonangioplastie mit Endotheldenudation, bei der zusätzlich ein Mediaschaden gesetzt wird. Das Tier erhält obligatorisch eine Cholesterinkost über einen gewissen Zeitraum. In der darauffolgenden Angioplastie wird das zu testende Medikament appliziert und später der Restenosegrad gemessen. Bei diesem Versuchsansatz werden ähnliche Ausgangsbedingungen wie beim Menschen geschaffen. Die resultierenden Läsionen sind komplex und von großem Umfang. Aufgrund der Heterogenität der

Läsionen ist es jedoch schwierig, restenotisches von ursprünglichem, d.h. atherosklerotischem Gewebe zu unterscheiden (146, 147).

In unserer tierexperimentellen Studie wurde das atherosklerotische Modell gewählt. Durch Verabreichung einer cholesterinreichen Kost wurde ein hypercholesterolämischer Zustand erzeugt. Die gleichzeitige Induktion eines Gefäßtraumas durch die Ballonangioplastie beschleunigt die Progression der atherosklerotischen Läsionen (12).

Einige Tierspezies sollen nun im Hinblick auf die Atherosklerose und die Restenose vorgestellt werden.

Die größeren Tiermodelle, hier insbesondere das Schwein, haben, was die Koronargefäße betrifft, eine dem Menschen ähnliche Anatomie. Die Gefäße sind groß genug, um Angiographien durchzuführen. Zudem bestehen pathophysiologische Ähnlichkeiten hinsichtlich der Fähigkeit zur Ausbildung von atheromatösen Plaques. Auch die einem Gefäßwandtrauma folgende Proliferationsantwort ähnelt der beim Menschen und kann zur Neointima-Hyperplasie führen (121). Der prädiktive Wert von Studienergebnissen ist aber trotz allem limitiert. Zudem bestehen Unterschiede zwischen Schwein und Mensch im Bereich der Hämostase, was die Anwendung von Antikoagulanzen einschränkt (51, 122). Auch sind Schweine sehr groß und unhandlich. Miniaturschweine sind kleiner, dafür aber erheblich teurer. Gleiche Ergebnisse im Tiermodell und in klinischer Studie konnten lediglich in wenigen Therapieansätzen festgestellt werden. Unter anderem konnte durch Bestrahlung und durch Probucol, welches zur Gruppe der Antioxidantien gehört, eine Hemmung der Restenosebildung im Tiermodell und im Menschen beobachtet werden (71). Andere im Tierversuch erfolgreiche Studien mit Heparin, Acetylsalicylsäure, Hirudin, Prostacyclin und vielen anderen Medikamenten, zeigten in klinischer Erprobung keine Erfolge (71).

Bei den kleinen Tiermodellen bieten sich Ratten und Mäuse als Versuchstiere an. Das Karotisarterienmodell der Ratte ist ein besonders häufig verwendetes Tiermodell. Atherosklerose und Thrombose kommt bei diesen Tieren aber nicht natürlicherweise vor. Auch kann keine Hyperlipidämie simuliert werden (70). Zudem werden Interventionen aufgrund der kleinen Gefäßdurchmesser verkompliziert. Ein weiteres großes Problem ist, dass nicht ohne weiteres

Rückschlüsse von einem Gefäßabschnitt auf einen anderen gezogen werden dürfen. Die Art des untersuchten Gefäßes kann das Ergebnis einer Studie beeinflussen. Badimon et al. beobachteten dieses Problem in Koronar- und Karotisarterien, die unterschiedliche Reaktion auf PTCA zeigten (6).

Das in diesem Versuch gewählte Tiermodell ist das New Zealand Kaninchen. Die Tiere sind kostengünstig, ihre Haltung ist einfach und die Handhabung aufgrund der geringen Größe leicht. Es entwickelt sowohl spontan als auch nahrungsinduziert Atherosklerose. 1912 induzierte Antischkow das erste Mal durch Fütterung von reinem Cholesterol in Öl über einen längeren Zeitraum eine Atherosklerose im Kaninchen (2). Unter cholesterinreicher Kost entwickeln Kaninchen eine extreme Hypercholesterinämie, Xanthome und atheromatöse Läsionen, die eine geringe fibröse Komponente aufweisen, aber reich an lipid-beladenen Makrophagen sind. Restenotische Bezirke sind ebenfalls lipidreich und haben histologische Ähnlichkeit zur humanen Restenose. (121, 147).

In diesem Versuch kam es in hypercholesterolämischem Zustand, welcher durch die 1%ige Cholesterinkost herbeigeführt wurde, zu Xanthomen und makroskopisch sichtbaren Läsionen entlang der Aorta abdominalis. Weitere nahrungsinduzierten Wirkungen manifestierten sich an der Leber. Makroskopisch fielen mitunter Leberverfettungen auf. Zudem kam es zu Leberfunktionsstörungen, welche sich in Form von Aszites, Ikterus und Gerinnungsstörungen äußerten. Die Gefäßgröße der Kaninchen erlaubte die Verwendung von 4F-Schleusen bei den Interventionen. Post-operativ waren die Tiere nicht anfällig für Infektionen.

Es wurde jedoch auf Messungen des Serumcholesteringehalts verzichtet. Die Quantifizierung der Wirkung der Cholesterinkost auf den Cholesterinspiegel ist damit nicht möglich. Es lassen sich deshalb keine Aussagen darüber machen, wie hoch die Cholesterinkonzentrationen im einzelnen waren und wie stark oben beschriebene Befunde und Cholesterinkonzentration miteinander korrelierten. Darüber hinaus ist es auch nicht möglich, Aussagen über einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Intimahyperplasie und einer Hypercholesterinämie zu treffen.

Der prädiktive Wert der Versuchsergebnisse im Tiermodell bleibt weiterhin limitiert, was unter anderem große Studien wie die MERCATOR und die MARCATOR Studien beweisen haben. Die Suche nach dem geeignetsten Tiermodell geht weiter (14, 34, 39, 96).

4.2 Genterapie zur Prophylaxe der Restenose

Die Restenose tritt bei etwa 40% der Patienten nach zunächst erfolgreich durchgeführter Ballonangioplastie auf (103). Traumabedingt werden komplexe Kaskaden aktiviert, die letztendlich zur Neointimabildung mit erneuter Verengung des Gefäßlumens führen. Die entscheidenden Faktoren, die schon in Abschnitt 1.3 ausführlich erläutert wurden, seien hier noch einmal erwähnt: die VSMC, die Endothelzellen, die Plättchen, viele verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Makrophagen und die T-Lymphozyten. Ausgelöst durch die Gefäßverletzung kommt es zur Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation und zur Freilegung der subendothelialen Matrix aufgrund der Endotheldenudation. Die Thrombozyten degranulieren, die Makrophagen werden aktiviert und sezernieren ebenso wie die beschädigten Endothelzellen Zytokine und Wachstumsfaktoren. Weitere Makrophagen und auch die T-Lymphozyten werden rekrutiert und treiben die Entzündungsreaktion durch die Sekretion von inflammatorisch wirkenden Mediatoren weiter voran. Die VSMC werden aktiviert, sie proliferieren in der Media und wandern dann in die Intima, wo sie sich weiter teilen und die extrazelluläre Matrix synthetisieren. Letztlich kommt es zur Hyperplasie der Neointima. In vielen experimentellen und klinischen Studien konnte bislang keine überzeugende Therapie zur Prophylaxe einer Rezidivstenose nach der Ballonangioplastie gefunden werden. Die pharmakologische Therapie mit antiproliferativ oder antithrombotisch wirkenden Substanzen zeigte keine Erfolge (34, 52, 71, 87, 106, 144). Die Anwendung von radioaktiven Stents stellte sich als vielversprechender heraus. Stents verhindern vor allem das konstriktive Remodeling, können aber gleichzeitig eine starke In-Stent Restenose induzieren. Die Implantation von radioaktiven Stents verhindert zwar eine Neointimabildung, aber

über Langzeitfolgen können noch keine Aussagen getroffen werden (20, 37, 39, 57, 82, 125, 146). Ein mit dem Immunsuppressivum Sirolimus beschichteter Stent, der die Proliferation von glatten Muskelzellen und von Lymphozyten hemmt, hat sich in Studien als ebenfalls sehr erfolgreich herausgestellt. Sowohl bei Sousa et al. als auch in der RAVEL Studie zeigte keiner der mit dem Sirolimusstent behandelten Patienten eine relevante Restenose. Aber auch hier gibt es noch keine Daten über langfristige Nebenwirkungen (99, 118, 129).

Obwohl wir in unseren *in vivo*-Versuchen unter den genannten Bedingungen keinen Effekt der Therapie mit NF- κ B decoy-Oligonukleotiden hinsichtlich einer Hemmung der Neointimabildung nach der Ballonangioplastie nachweisen konnten, kann die Wirksamkeit der Gentherapie nicht ausgeschlossen werden. Unsere *in vitro*-Daten zeigten beispielsweise vielversprechende Resultate. Auch werden von vielen anderen Versuchsgruppen positive Ergebnisse in gentherapeutischen Studien gemeldet.

Im Bereich der Therapie mit antisense-ODN zur Restenoseprophylaxe wurde bislang unter anderem mit den Zellzyklus regulierenden Genen c-myc, c-myb, cdc 2, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und Thymidinkinase experimentiert. Bei der antisense-Therapie wird die Zelle mit einer zur einzelsträngigen (prä-) mRNA komplementären antisense-Sequenz transfiziert. Diese fügt sich mit der komplementären mRNA zu einem Doppelstrang zusammen, was die weitere Prozessierung der mRNA unmöglich macht und die Synthese des Proteins verhindert oder zumindest verringert. Simons et al. wiesen 1992 die Wirksamkeit von antisense-ODN gegen das c-myb Proto-Onkogen zur Prophylaxe der Restenose im Rattenmodell nach (127). Auch die gezielte Anwendung von antisense-ODN gegen PCNA und gegen cdc 2 Kinase zeigte im Rattenmodell eine Hemmung der Intimahyperplasie nach der Ballonangioplastie für einen Zeitraum von mindestens acht Wochen nach der Transfektion (100). Ebenso wiesen Mann et al. die Inhibition der Intimahyperplasie durch die Transfektion von antisense-ODN gegen die cdc 2 Kinase und PCNA in Venenbypässen nach (92).

Wie in 1.4.3 schon beschrieben steht der antisense-Therapie die Therapie mit doppelsträngigen decoy-Oligonukleotiden gegenüber.

Die Transfektion mit decoy-ODN, welche das cis-Element nachahmen, führt zur Bindung des jeweiligen Transkriptionsfaktors und zur Hemmung dessen Funktion (103).

Morishita et al. gelang es 1995 erstmals, die Wirksamkeit der decoy-ODN Strategie *in vivo* nachzuweisen. Ihnen gelang die *in vivo*-Transfektion von VSMC in Rattenkarotiden mit E2F decoy-ODN zur Prävention der Neointimabildung nach einer Ballonangioplastie. Sie konnten nachweisen, dass decoy-ODN und nicht scrambled-ODN oder mismatched-ODN die Proliferation von VSMC bis zu acht Wochen nach der Applikation hemmen, indem sie als cis-Elemente den Transkriptionsfaktor E2F binden und damit die Genexpression blockieren. Gleichzeitig wurde eine Abnahme der mRNA für die cdc 2 Kinase und PCNA notiert (101).

Die decoy-ODN Strategie wird von Morishita dabei aus verschiedenen Gründen als besonders attraktiv beschrieben:

1. Es existieren viele und leicht zu identifizierende Angriffspunkte (Transkriptionsfaktoren) für die Pharmakotherapie.
2. Die Synthese sequenz-spezifischer Decoys ist relativ einfach und kann auf bestimmte Gewebe gerichtet werden.
3. Die Kenntnis der exakten Molekularstruktur des Transkriptionsfaktors ist nicht notwendig.
4. Die decoy-ODN sind effektiver als die antisense-ODN, denn sie können eine Vielzahl unterschiedlicher oder auch nur gelegentlich exprimierter Transkriptionsfaktoren blockieren, wenn diese an dasselbe cis-Element binden (103).

Die Therapie mit E2F decoy-ODN kam in der PREVENT Studie zu einer ersten klinischen Anwendung. Die Studie wurde an 41 Patienten, die sich einer Bypass-Operation unterzogen, durchgeführt. Intraoperativ wurden die entnommenen Venensegmente mit den E2F decoy-ODN transfiziert. Hierbei kam es zu einer Hemmung der Expression von PCNA und c-myc und als klinisch relevantes Ergebnis zu einer Reduktion der Intimahyperplasie. Nach zwölf Monaten wies keiner der Patienten eine kritische Stenose auf (93).

In einer weiteren klinischen Studie zur Restenoseprophylaxe nach einer Angioplastie wurde ebenfalls die decoy-Therapie mit E2F-ODN angewandt.

Die Applikation erfolgte über einen Hydrogel-Katheter. Jeweils sechs Monate nach der Applikation der decoy-ODN zeigte keiner der fünf behandelten Patienten Nebenwirkungen. Die Langzeitergebnisse stehen jedoch noch aus (104).

Es gibt jedoch viele Probleme beim Einsatz von ODN, die auch in unserem Versuch eine Rolle gespielt haben könnten. Unter anderem sind hier die kurze Halbwertszeit der ODN, die niedrige Applikationseffizienz, die Degradierung der ODN durch Endozytose und durch Nukleasen wichtig (69, 103, 104).

Weiterhin gibt es noch unspezifische Effekte, die bei jeder Therapie mit ODN auftreten können. Es kann zu Interferenzen der ODN mit den Oberflächenrezeptoren der Zellen oder mit anderen Proteinen kommen, welche nicht sequenzspezifisch sein müssen. Aber auch die sequenz-spezifische Bindung von anderen Proteinen, d.h. keinen Transkriptionsfaktoren, an die ODN, kann dessen gentherapeutische Wirkung beeinträchtigen (104).

Die Einschleusung von DNA-Bestandteilen birgt auch das Risiko von Nebenwirkungen. Von besonderer Bedeutung sind Phosphorthiosäure-substituierte ODN, welche insbesondere bei Bolusinjektionen in hohen Dosen toxisch sind und zu Nierenschäden, erhöhten Leberwerten und zur Hypotension führen. Henry et al. wiesen zudem nach, dass hohe Dosen über einen längeren Zeitraum gegeben zu Nierenschädigungen mit den Symptomen der Proteinurie und Leukozyturie führten. Diese toxischen Nebenwirkungen können durch intravenöse Infusionen in niedrigen Dosierungen vermieden werden (59). Darüber hinaus liegen Hinweise vor, dass Oligonukleotide, die GC-Dinukleotide enthalten, nicht nur eine Immunreaktion hemmen, sondern diese auch induzieren können. Diese Effekte sind jedoch bei der lokalen Pharmakotherapie nicht zu erwarten (79).

Zu guter Letzt bleibt die Frage offen, ob die Anwendung von Transkriptionsfaktor-decoys zeitlich gesehen nur dann Sinn macht, wenn die Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung kommen, nämlich in der akuten Phase einer Erkrankung (104).

4.2.1 Betrachtung von NF- κ B

Restenose ist wie schon erwähnt ein häufiges Problem, das nach zunächst erfolgreicher Angioplastie auftritt. Traumabedingt werden komplexe Kaskaden aktiviert, die letztendlich zur Neointimabildung mit erneuter Verengung des Gefäßlumens führen.

NF- κ B ist ein von der Evolution bewahrter ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor (44). Während Baltimore et al. NF- κ B zunächst nur in reifen B-Zellen und Plasmazellen als Enhancer der κ -Leichtkette nachwiesen (124), weiß man heute, dass NF- κ B ubiquitär vorhanden ist und eine zentrale Rolle in Immun- und Entzündungsreaktionen und bei der Apoptose spielt (134, 149). Überexpression von NF- κ B findet man bei unterschiedlichen entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis (54), dem Asthma (56), den entzündlichen Darm-erkrankungen (107), bei der Multiplen Sklerose und der Atherosklerose (24).

Obwohl in unseren Versuchen keine Hemmung der Intimahyperplasie durch die Applikation von NF- κ B decoy-ODN gesehen werden konnte, sprechen viele Ergebnisse von anderen Gruppen dafür, dass NF- κ B eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Rezidivstenose spielt. Auch zeigten andere Arbeitsgruppen, dass die Aktivierung von NF- κ B auf unterschiedliche Arten gehemmt werden kann mit der Folge einer reduzierten Intimahyperplasie.

Eine große Bedeutung für die Restenose stellt die Induktion von NF- κ B in den VSMC dar. In einer *in vitro*-Studie zeigten Obata et al., dass die Induktion von NF- κ B in glatten Muskelzellen aus der Aorta von Ratten durch die Mitogene PDGF-BB, bFGF, EGF und IGF-1 erfolgt. Sie konnten zudem nachweisen, dass sich der induzierte Transkriptionsfaktor NF- κ B in den VSMC aus den Untereinheiten p50 und p65 zusammensetzt. In den unstimulierten glatten Muskelzellen fanden sie eine geringe aber signifikante Konzentration der Untereinheit p50, aber kein p65, woraus sie schlossen, dass nur p50 kontinuierlich exprimiert wird. Nach Stimulation fanden sie einen starken Konzentrationsanstieg von sowohl p50 als

auch p65, wobei durch PDGF-BB und bFGF eine höhere κ B-Bindungsaktivität zu messen war als unter EGF und IGF-1 Einfluss (109). Die Modelle über die Beteiligung des NF- κ B-/I- κ B-Systems wurden vor allem aufgrund von *in vitro*-Versuchen postuliert, jedoch weiß man weitaus weniger über die Rolle von NF- κ B *in vivo*. Lindner gelang in verletzten Rattencarotiden *in vivo* der Nachweis, dass es infolge einer NF- κ B Aktivierung nach nur vier Stunden zu einer verstärkten Expression von VCAM-1 und MCP-1 in den Endothelzellen und den VSMC kommt. Dieses Ereignis wird gefolgt von einer vermehrten Adhäsion von Monozyten und Makrophagen (88).

Unterschiedliche Therapieansätze mit dem Ziel der Hemmung von NF- κ B konnten hinsichtlich einer Restenoseprophylaxe Erfolge verbuchen, die wir in unseren Versuchen mit der decoy-Technik nicht nachweisen konnten. Dabei wurden verschiedene Vorgehensweisen gewählt. Nakajima et al. fanden eine Beteiligung der NF- κ B Aktivierung bei der Thrombin-induzierten Proliferation der VSMC. Sie wiesen einen Zusammenhang zwischen Stimulation des Thrombin-Rezeptors und der NF- κ B-Aktivität nach. Die Stimulation des Rezeptors durch Thrombin und TRAP (Thrombin receptor agonist peptide) führte zur Bildung von drei κ B-bindenden Komplexen I, II und III, wobei die Komplexe I und III das p65 Homodimer enthielten. Weiter konnten sie nachweisen, dass die Applikation von antisense-Oligonukleotiden gegen NF- κ B p65 antiproliferative Effekte auf die VSMC *in vitro* hat (105).

Die Aktivierungshemmung von NF- κ B war eine Herangehensweise, die Wang et al. wählten. Sie transfizierten humane VSMC *in vitro* mit einer Mutante des I- κ B α . I- κ B ist der Inhibitor des kappa B, bindet an NF- κ B und hemmt so dessen Aktivierung. Aufgrund der Mutation im I- κ B α wurde eine Phosphorylierung und Degradierung verhindert. So konnten sie eine Inhibition der Genexpression der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α aufzeigen mit einer nachfolgenden Hemmung der Proliferation der VSMC (142).

Auch in implantierten Stents wurde versucht, die Bildung einer Neointima zu hemmen. Cejna et al. gelang dies 2002 ebenfalls durch die *in vivo*-Transfektion

von I- κ B α im Kaninchen. Sie konnten eine Reduktion der Intimahyperplasie bis zu vier Wochen nach der Stentimplantation nachweisen (20).

Cercek et al. präsentierten einen nicht-gentherapeutischen Weg der NF- κ B-Inhibition in Ratten. Die intravenöse Gabe von 100 mg Aspirin/kg Körpergewicht führte sowohl zu einer Hemmung der Translokation von NF- κ B in den Zellkern als auch zur Hemmung der DNA-Bindung von NF- κ B. Daraus resultierte eine Inhibition der Expression von ICAM-1 und im folgenden eine Abnahme der Proliferation der glatten Muskelzellen. Dieses Ergebnis bleibt jedoch wegen der hohen Dosierung des Aspirins ohne klinische Relevanz (21).

In ihren Versuchen konnten Autieri et al. belegen, dass die Anwendung von antisense-Oligonukleotiden zur Untereinheit p65 von NF- κ B zu einer Hemmung der Proliferation der VSMC führt. Sie dokumentierten in diesen Versuchen ebenfalls, dass die Verwendung von ODN zur Untereinheit p50 ohne Wirkung blieb. In dem Tiermodell Ratte zeigten sie zudem eine Hemmung der Neointimabildung nach der Ballonangioplastie. (5).

Der Gruppe um Morishita gelang 1997 der erste *in vivo*-Transfer von NF- κ B decoy-ODN (7). Sie demonstrierten am Beispiel des Myokardinfarkts eine Einsatzmöglichkeit von NF- κ B-ODN. Infarktbedingt werden Gene zur Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen aktiviert, welche durch NF- κ B reguliert werden. In dem Versuch konnte eine Abnahme der Level von IL- und VCAM-mRNA unter der decoy-Therapie gemessen werden, was zu einer Begrenzung des Infarktareals führte. Dieser Effekt konnte in demselben Versuch beim Einsatz von antisense-ODN, welche gegen iNOS (inducible nitric oxide synthase) gerichtet waren, nicht nachgewiesen werden (102).

Des weiteren gelang Yoshimura 2001 die *in vivo*-Transfektion von NF- κ B decoy cis-Elementen in Rattencarotiden, an denen zuvor durch eine Angioplastie ein Gefäßtrauma gesetzt worden war. Sie konnten, was in der hier vorliegenden Studie nicht gelang, die Hemmung der Intimahyperplasie und zudem die Hochregulation des pro-apoptotischen Gens p53 in der Neointima mit nachfolgender vermehrter Apoptose von VSMC 14 Tage nach Ballonangioplastie aufzeigen. Darüber hinaus fanden sie eine Abnahme der Genexpression von ICAM-1 und VCAM-1 in den

transfuzierten Gefäßen und eine Hemmung der Migration von Makrophagen und T-Lymphozyten in die Media. Genannte Ereignisse konnten in den mit scrambled-ODN behandelten Gefäßen nicht vorgewiesen werden (148).

In einer weiteren Studie untersuchten Mann et al., diesmal jedoch am Beispiel von Venenbypässen, die Wirksamkeit einer ODN-Therapie. Nach einer einmaligen intraoperativen Applikation von Oligonukleotiden zur Inhibition von Zellzyklus-regulierenden Genen konnten sie im Kaninchenmodell eine über sechs Monate andauernde Hemmung der Neointima-Hyperplasie nachweisen (92).

4.2.2 Vektoren

Die Wahl des geeigneten Vektorsystems ist ein wesentlicher Parameter für eine erfolgreiche Therapie (111). Viele Vektorsysteme sind bislang getestet worden, doch alle weisen spezifische Vor- und Nachteile auf (110). Werden die heutigen Strategien zum Gentransfer *in vivo* angewandt, erweisen sie sich trotz aller bisherigen Erfolge *in vitro* als ineffektiv (111).

Die Verwendung von viralen Vektoren bietet die höchste Effizienz hinsichtlich eines erfolgreichen Gentransfers. Insbesondere adenovirale Vektoren werden häufig verwendet und sind sehr effizient. Allgemein können Viren in hohen Titern produziert werden und können viele unterschiedliche Zelltypen, unter anderem auch ruhende Zellen, infizieren (128). Viren bergen aber, wenn *in vivo* angewandt, das Risiko, mutagen zu wirken oder eine Immunreaktion hervorzurufen, die zur Zerstörung der infizierten Zellen führen kann (94, 135). Die nicht-viralen Vektoren haben eine wesentlich niedrigere Erfolgsrate. Die Lipofektion zum Beispiel, d.h. die Verwendung eines Liposoms zur Transfektion von Zellen, hat eine um das zehnfache niedrigere Transfektionseffizienz als ein viraler Vektor, ist dafür aber sicherer (83). In unserem Versuchsaufbau haben wir uns für die Lipofektion mit dem liposomalen Vektor Tfx-50 entschieden. Dieser hatte sich in den *in vitro*-Vorversuchen als geeignet herausgestellt. Werden Vektorsysteme, die zuvor erfolgreich *in vitro* getestet wurden, *in vivo* angewendet, muss man wesentlich niedrigere Transfektionsraten feststellen. Die Gründe dafür werden nach Pelisek et al. im folgenden genannt. Die VSMC befinden sich zum Zeitpunkt der Angioplastie in einer Ruhestellung. Erst etwa sieben Tage nach der PTA erreicht

die Proliferation der Zellen ihren Höhepunkt. *In vitro* wird aber meistens von einem schon erhöhten Proliferationsindex zum Interventionszeitpunkt ausgegangen und dementsprechend ein Transfektionssystem entwickelt. Überträgt man dieses System auf die *in vivo* vorherrschenden Bedingungen, können die *in vitro*- Versuchsergebnisse oft nicht bestätigt werden. Die Transfektionseffizienz scheint in sich teilenden Zellen etwa um das drei- bis zehnfache gegenüber ruhenden Zellen erhöht zu sein. Wählt man hingegen ein geeignetes System, das an nicht-proliferierenden Zellen *in vitro* getestet worden ist, kann man *in vivo* wesentlich höhere Transfektionsraten verzeichnen. (111). Geht man von Peliseks Ergebnissen aus, könnte dies eine mögliche Erklärung sein, warum in unseren *in vitro*-Versuchen ein anti-proliferativer Effekt zu verzeichnen war und die *in vivo*-Versuche unter Verwendung gleicher Substanzen keine Wirkung zeigten. Auch hier wurde zunächst in Wachstumsmedien *in vitro* die Möglichkeit eines Gentransfers getestet und dann *in vivo* angewendet.

Bei der genaueren Betrachtung von Studien, die eine Proliferationshemmung der VSMC erzielen konnten, ist es wichtig, diese auch hinsichtlich der verwendeten Vektoren zu analysieren. In den in Abschnitt 4.2.1 erwähnten Versuchen von Cejna (20), Wang (142) und Breuss (16), die alle einen anti-proliferativen Effekt ihrer applizierten Substanzen zeigten, wurden adenovirale Vektoren verwendet. Obwohl andere Gruppen dem Adenovirus die Induktion von Entzündungsreaktionen zuschreiben, konnten Breuss et al. in ihren Versuchen keine pro-inflammatorische Wirkung durch das adenovirale Konstrukt entdecken. Sie führten diesen Effekt auf die ausbleibende Entzündungsreaktion aufgrund der Aktivierungshemmung von NF- κ B zurück (16, 20). In den in den Abschnitten 4.2 und 4.2.1 zitierten Versuchen von Morishita kamen Hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-Liposom-Komplexe zur Anwendung. Morishita et al. gebrauchten sie erfolgreich zum Gentransfer von E2F decoy- und NF- κ B decoy-Oligonukleotiden *in vivo*. Diese Methode wird als sehr effizient und nur gering toxisch beschrieben. Auch wird die maximal mögliche Größe des zu transportierenden DNA-Moleküls durch diese Komplexe nicht limitiert.

Die klinische Verwendbarkeit des HVJ-Liposom-Komplexes bleibt jedoch aufgrund der Schwierigkeiten, den Vektor in großen Mengen zu produzieren, begrenzt (101, 102, 135).

Die Sicherheitsbedenken hinsichtlich einer möglichen Mutation oder Reversion des eingeschleusten Virus oder einer Kontamination mit dem Virus limitieren den klinischen Einsatz der viralen Vektoren. Es gilt deshalb, diese Vektoren noch weiter zu erforschen (94).

Die liposomalen Vektoren sind hingegen wesentlich unbedenklicher in der Anwendung. Sie sind leichter und in größeren Mengen herzustellen als virale Vektoren. Die Anwendung ist zudem einfacher. Auch können Liposomen größere DNA-Moleküle transportieren als die viralen Vektoren. Ihre Wirksamkeit bleibt jedoch hinter der viralen zurück (110). Es wurden deshalb viele Studien zur Entwicklung besserer nicht-viraler Vektoren durchgeführt.

Der synthetische Vektor LID, der sich aus dem Liposom Lipofectin (L), einem Integrin-bindendem Peptid (I) und einer Plasmid-DNA (D) zusammensetzt, wurde von Parkes et al. entwickelt (110). Einige Viren machen sich die Integrine zunutze und binden über diese Membranproteine an die Zielzellen. Durch das Integrin-bindende Peptid sollte ähnlich eines viralen Vektors die Zellbindung von LID an die Membranprotein verstärkt werden. Die Transfektionseffizienz in VSMC *in vitro* betrug über 40%, in Endothelzellen 35%. Dabei zeigte sich jedoch, dass die VSMC keine Rezeptorspezifität aufwiesen, d.h. sie konnten auch durch einen Vektor, zusammengesetzt aus einem Peptid aus der Kontrollgruppe, transfiziert werden. Um das Potential des LID Vektors noch besser nutzen zu können, schlagen die Autoren vor, neue Peptide mit höherer Zellaffinität zu verwenden (110).

Armeanu et al. (3) testeten verschiedene nicht-virale Vektorsysteme an VSMC hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz. Dabei schnitt das polykationische Sperminderivat DOCSPER am besten ab. Andere polykationische Vektoren wurden daraufhin mit DOCSPER 100 verglichen. Das auch von uns verwendete Tfx-50 wies dabei eine Transfektionseffizienz von lediglich 0,35 zu DOCSPER 100 auf. Alle anderen Vektoren zeigten ebenfalls geringere Transfektionsraten (0,13 bis 0,83 relativ zu DOCSPER 100).

Auch Hellgren et al. verglichen einen neueren Vektor, FuGene-6, unter anderem mit Tfx-50. Sie transfizierten Fibroblasten mit einem Plasmid mit dem Code für VEGF (vascular endothelial growth factor). Anhand der von den Fibroblasten sezernierten Menge des Genprodukts VEGF maßen sie die Effizienz des Gentransfers. Unter Verwendung von FuGene-6 lag die Sekretion der Fibroblasten des Kaninchens bei 2400 ng VEGF/ml Medium. Die Sekretion unter Tfx-50 lag wesentlich niedriger. Auch bei der Anwendung der Vektoren *in vivo* war FuGene-6 dem Tfx-50 überlegen (58).

Eine neuere Technik des Gentransfers ist die sogenannte Sonoporation. Bei der Sonoporation wird mittels Ultraschall vorübergehend die Permeabilität der Zellmembran im Sinne eines reversiblen Membranschadens erhöht. Dabei entstehen Poren in der Membran durch die Makromoleküle wie DNA in die Zelle gelangen. Die Poren schließen sich wieder und die Moleküle werden intrazellulär gespeichert (10, 135).

Bao gelang es mit Hilfe von Ultraschall bei 2,25 MHz, Dextran in Zellen einzuschleusen. Bei Dextran handelt es sich um ein Makromolekül (580 000 MG), das normalerweise nicht die Zellmembranen permeieren kann. Dabei trat in Abhängigkeit von der Druckamplitude entweder die Permeation der Substanz in die Zelle oder eine Zelllyse auf. Zusätzlich konnten sie eine Luciferase Plasmid-DNA in die Zellen einbringen. Auch hier galt es, ein Gleichgewicht zwischen Transfektion der Zelle und irreversibler Membranschädigung zu finden. Mit steigender Druckamplitude nahm zwar die Luciferaseproduktion zu, aber gleichzeitig verringerte sich die Zellproliferation (10).

Den Ultraschall machten sich ebenfalls Lawrie et al. zunutze und steigerten damit Transfektionsraten. Sie transfizierten VSMC *in vitro* mit Hilfe des Vektors Tfx-50 mit einer Luciferase Plasmid-DNA. Gleichzeitig zur Lipofektion wurden die Zellen für 60 sec bei 1 Mhz (0,4 W/cm²) dem Ultraschall exponiert. Die Luciferaseaktivität steigerte sich bei diesen Zellen um das dreifache gegenüber den nicht mit Ultraschall behandelten Zellen. Andere Versuchsgruppen verzeichneten eine Steigerung der Transfektionseffizienz um das zwei- bis tausendfache (83).

Taniyama et al. transfizierten ebenso Zellen mit einer Luciferase Plasmid-DNA (135). Dabei verwendeten sie sowohl die nackte DNA als auch die Plasmid-DNA mit Ultraschall oder mit Ultraschall und sogenannten Optisons. Unter Optisons versteht man Perfluorocarbon-gefüllte echokonstrast Microbubbles mit einer Albuminhülle. Die Wirkungsweise der Optisons ist noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass sich bei der Ruptur der Blasen die Membranfluidität erhöht und somit eine vermehrte zelluläre Aufnahme der therapeutischen Substanz erfolgen kann. Auch steht eine vermehrte Porenbildung in der Membran zur Diskussion (97). Die *in vitro*-Transfektion der Plasmid-DNA unter einminütiger Anwendung von Ultraschall (2,5 W/cm²) ergab eine um das 70fache erhöhte Luciferaseaktivität verglichen mit der Transfektion von nackter Plasmid-DNA allein. Die zusätzliche Verwendung von Optisons zum Ultraschall steigerte die Luciferaseaktivität um das 8000fache. *In vivo* ergab sich bei der Transfektion mit Hilfe von Ultraschall und Optison eine um das 1000fach erhöhte Luciferaseaktivität gegenüber alleiniger Anwendung der Plasmid-DNA. Bei der Transfektion der Zellen mit einer p53 Plasmid-DNA während einer Ballonangioplastie wurde zwei Wochen nach Applikation mit Hilfe von Ultraschall und Optisons ein signifikant reduziertes Intima/Media-Verhältnis gemessen (135).

Die Optisons wurden auch von Miura et al. verwendet. Sie exponierten Zellen Ultraschall bei 1,0 W/cm² unter gleichzeitiger Applikation von Optisons. Dabei gelang ihnen bei einer Transfektionseffizienz von 25 % die Einschleusung von antisense-Oligonukleotiden in die Zellen. Die Anwendung der Optisons mit Ultraschall stellte sich als effektiver dar als der Ultraschall allein (97).

Berücksichtigt man die Versuchsergebnisse anderer Gruppen, die den Vektoren eine sehr wichtige Rolle für einen erfolgreichen Gentransfer zuschreiben, war eventuell die Transfektionseffizienz des Vektors Tfx-50 zu gering. Aber da Tfx-50 teilweise gute *in vitro*-Transfektionsraten aufweisen kann, liegt möglicherweise ein Problem bei der *in vivo*-Anwendung (3,58). Pelisek et al. beobachteten einen Einfluss der Proliferationsrate der Zellen auf eine erfolgreiche Transfektion. Während viele *in vitro*-Versuche an proliferierenden Zellen durchgeführt werden, befinden sich Zellen *in vivo* zum Zeitpunkt der Ballonangioplastie meist in einem

ruhenden Stadium. Ein an sich teilenden Zellen getesteter Vektor vermag an ruhenden Zellen nicht dieselben Transfektionsraten zu erzielen (111). Ebenso wirkt sich auch der Zelltyp auf die Transfektion aus (140). Auch kann es zu Interaktionen des Vektors mit dem Serum oder mit Blutzellen kommen, so dass die Zielzellen nicht erreicht werden können (111, 140)

Es müssen weitere Versuche mit optimierten liposomalen Vektoren durchgeführt werden, die individuell für die jeweiligen Zielzellen entwickelt worden sind. Auch sollte die Anwendbarkeit von Ultraschall und Microbubbles weiter verbessert werden.

4.3 Diskussion der lokalen Pharmakotherapie

Die niedrigen Transfektionsraten *in vivo* warfen neben der Frage des geeigneten Vektors die Frage nach einem geeigneten Applikationssystem auf. Die Entwicklung neuer Kathetersysteme ermöglicht es, eine Substanz lokal in hoher Konzentration zu applizieren. Dadurch werden einerseits die systemischen Nebenwirkungen reduziert, andererseits werden die teuren Substanzen sparsamer verwendet (1, 128).

Ob eine lokal verabreichte Substanz lediglich an der Applikationsstelle zur Wirkung kommt, ohne die unerwünschten systemischen Nebenwirkungen zu verursachen, untersuchten Edelman et al. in einer Studie mit dem antiproliferativ und antithrombotisch wirkendem Heparin. Sie zeigten, dass nach einer zuvor bei Ratten durchgeführten Ballondenudation sowohl die intravenöse als auch die lokale Gabe von Heparin zu einer Hemmung der Neointimabildung führt. Dabei konnte lediglich in der Gruppe der systemischen Heparin-gabe eine Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit, nicht jedoch bei lokaler Applikation gemessen werden (31).

Durch den schon in Abschnitt 4.2 erwähnten Versuch von Simons et al. konnte ebenfalls bestätigt werden, dass es bei topischer Anwendung von antisense-Oligonukleotiden des c-myc Protoonkogens nur an der Applikationsstelle zu einer signifikanten Inhibition der Intimahyperplasie kommt. Dieser Effekt konnte an den

proximal und distal der Katheterlokalisation gelegenen Gefäßsegmenten nicht festgestellt werden (127).

4.3.1 Einfluss der Applikationsparameter

Die Effizienz der lokalen Pharmakotherapie korreliert mit dem bei der Applikation aufgetragenen Druck. Je größer der Druck, desto höher die Effizienz der Applikation. Jedoch ist das daraus resultierende Trauma der Gefäßwand ebenso umso erheblicher, je größer der Applikationsdruck ist. Auch ist die Menge des Applikationsvolumens mit am Ausmaß der Gefäßwandschädigung beteiligt. Dadurch kann die positive Wirkung der applizierten Substanz zunichte gemacht werden (8, 63, 64, 80).

Für eine effiziente Applikation ist der Kontakt des Katheters mit der Gefäßwand von besonderer Bedeutung. Dies ist jedoch wiederum abhängig vom Plaquetyp und der Dehnbarkeit der Wand. Mittlere Drücke von 2 bis 5 atm werden benötigt, um direkten Wandkontakt herzustellen. Applikationen bei Drücken von 5 bis 10 atm erzeugen schwere Gefäßtraumen. Die aus dem Trauma resultierende Reaktion besteht in einer überschießenden Wundheilung mit starker Proliferation. Thrombogene, subendotheliale Strukturen werden freigelegt, und Gerinnungskaskaden werden aktiviert. Kleinere Applikationsvolumina mit höher konzentrierten Wirkstoffen scheinen weniger traumatisch und effizienter zu sein als größere Applikationsvolumina. Die gemessenen Applikationsdrücke sind abhängig von mehreren Faktoren, unter anderem vom Umgebungsdruck, der Größe und Anzahl der Poren und Länge und Durchmesser des Katheters (7).

Santoian et al. sahen bei der Verwendung eines porösen Ballonkatheters bei Drücken von 10 atm häufiger Einrisse in der Media als bei der Applikation unter einem Druck von 5 atm (119). Auch Kimura et al. bestätigen diese Ergebnisse. Sie stellten einerseits fest, dass bei höheren Applikationsdrücken über 5 atm die Penetration der Markersubstanz bis in die Adventitia hinein erfolgte. Andererseits beobachteten sie gleichzeitig, dass mit zunehmendem Druck auch die Gefäßwandschäden und die nachfolgende Intimahyperplasie zunahmen (80).

Es stellt sich die Frage, ob ein Gefäßtrauma, das durch die lokale Pharmakotherapie induziert wird, den Nutzen der lokalen Applikation übersteigt. In anderen Versuchen unserer Studiengruppe wurden verschiedene Applikationsparameter und deren Auswirkung hinsichtlich einer Intimahyperplasie untersucht. Es zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Ballonangioplastie mit einem Druck von 8 atm und lokaler Applikation von Substanzen bis zu einem Druck von 4 atm und einem applizierten Volumen von 5 ml im Gegensatz zu alleiniger Ballonangioplastie keine signifikante Neointimahyperplasie induziert wurde. Auf diese Versuchsergebnisse wurde auch in der vorliegenden Studie Bezug genommen. Entsprechend erfolgte die lokale Medikamentenapplikation mit einem Volumen von 2 ml bei 2 atm (74).

4.3.2 Beurteilung des channeled-balloon Katheters

Der channeled-balloon Katheter wurde von Hong et al. entwickelt. Der Vorteil dieses Ballonkatheters ist, dass gleichzeitig, und nicht wie bei anderen Kathetern nacheinander mit zwei verschiedenen Kathetern, die Ballonangioplastie und die Medikamentenapplikation erfolgen kann. Es wird so sichergestellt, dass die Pharmakotherapie genau an der Stelle des größten Barotraumas erfolgt. Zur topischen Applikation werden nur geringe Drücke benötigt, was die sogenannten jet stream injuries, also die Druckstrahlschäden, die bei hohen Applikationsdrücken vorkommen, verhindert (63).

Die Möglichkeit eines effizienten Medikamententransfers demonstrierten Hong et al. zunächst an gesunden Arterien (63). Später erbrachten sie den Nachweis, dass mit Hilfe des channeled-balloon Katheters auch in atherosklerotisch veränderten Gefäßen Medikamente eingebracht werden können (64). Sie konnten zwei verschiedene Marker (Horseradish Peroxidase mit einer Molekülgröße von 0,005 µm und fluoreszierendes Heparin mit einer Molekülgröße von etwa 1,0 µm) nach der Applikation in der Gefäßwand von humanen atherosklerotischen Arterien *ex vivo* nachweisen. Die Marker befanden sich im Intimaplaque, in der Media und teilweise in der Adventitia. Ebenso konnten sie die Marker nach einer *in vivo*-Applikation im Kaninchen und anschließender Abtötung der Versuchstiere nach einer Inkubationszeit von 30 min transmural in der Gefäßwand und insbesondere

in den Dissektionsflächen nachweisen. Hier jedoch war die benötigte Applikationszeit wesentlich länger als bei der *ex vivo* Applikation, was wohl durch die stärkere Stenosierung der Gefäße und durch die Verwendung kleinerer Ballons aufgrund des geringeren Durchmessers der Kaninchenarterien bedingt war. Der Nachweis von Horseradish Peroxidase in einem erst eine Stunde nach Applikation abgetöteten Tier gelang nicht. Daraus wurde geschlossen, dass solche kleinen Moleküle nicht über längere Zeit in der Gefäßwand gehalten werden können. Als Applikationsdruck wurden 2 atm gewählt. Verglichen mit den Applikationsparametern der vorhergehenden Versuche erwies sich dies als ausreichend und der Druck hinterließ ein geringeres Trauma als die Applikation bei 4 atm (63, 64). Bei der Verwendung des channeled-balloon Katheters mit einem Applikationsdruck von 4 atm beobachteten Kalinowski et al. ebenfalls schwere Gefäßschäden mit einer Zunahme der Neointimaformation (73).

In weiteren Versuchen konnten Hong et al. zeigen, dass größere Moleküle, in diesem Fall Mikrosphären mit einer Molekülgröße von 3,0 µm, nicht aber noch größere mit einer Molekülgröße von 15,0 µm, noch 24 Stunden nach Applikation intramural zu finden waren. Gründe dafür können sein, dass ab einer bestimmten Molekülgröße Partikel nicht mehr durch den channeled-balloon Katheter appliziert werden können, oder dass die Applikation unter höheren Drücken zu erfolgen hat (64).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Westedt et al. Bei Verwendung derselben Applikationsparameter wie in unserem Versuch (Applikationsdruck von 2 atm und Dilatationsdruck von 8 atm) fanden sie eine größenabhängige Ablagerung von fluoreszenz-markierten Polystyren Nanopartikeln in der Gefäßwand. Während Nanopartikel mit einem Durchmesser von 100-200 nm bis in die innere Wand vordrangen, reicherten sich Nanopartikel mit 514 nm Durchmesser nur an der luminalen Oberfläche der Aorta an (145).

Auch wir entschieden uns in dieser Studie für den Applikationsdruck von 2 atm und für ein Applikationsvolumen von 2 ml. In unseren in 4.3.1 erwähnten Versuchen in demselben Stenosemodell unter Verwendung des channeled-balloon Katheters konnten diese Parameter bestätigt werden (74).

Es gibt jedoch einige Probleme, die bei der Anwendung des channelled-balloon Katheters auftreten, die möglicherweise auch das Ergebnis der vorliegenden Studie beeinflusst haben.

Bei mehrfacher Benutzung desselben Katheters und auch bei der Anwendung kleinerer Ballons in stenosierten Gefäßen verlängerten sich die Infusionszeiten (64). Die lange Infusionsdauer limitiert deshalb die klinische Anwendbarkeit dieses Kathetertyps, denn der Ballon erlaubt keine distale Perfusion eines Gefäßes. Der Ballon wird durch den Entfaltungsdruck dicht an die Gefäßwand angelagert. Dadurch wird ein vorzeitiger Abtransport der zu applizierenden Substanz vermieden. Es kann sich jedoch ein Reservoir mit Wirksubstanz innerhalb des Ballons bilden, welches nach Deflation des Ballons ausgewaschen werden kann (48). Bei unvollständigem Wandkontakt wird die Substanz einerseits nicht gleichmäßig ins Gewebe abgegeben, andererseits wird sie auch besonders schnell mit dem Blutstrom abtransportiert. Die Verteilung einer Substanz in der Gefäßwand ist zusätzlich von anderen anatomischen Barrieren wie den Plaques, der Gefäßoberfläche und dem Bindegewebe abhängig (145). Westedt et al. zeigten, dass die Plaques auf der Endotheloberfläche Moleküle ab einer Größe von 57 nm an der Penetration der Gefäßwand hinderten. Entlang der Lamina elastica externa fanden sie 217 nm große Nanopartikel perlschnurartig aufgereiht, die das Bindegewebe nicht durchdringen konnten. Darüber hinaus zeigten andere Studien, dass Partikel mit einer Größe von 5 bis 10 µm Entzündungsreaktionen mit nachfolgender Fibrose auslösen (49).

In weiteren Versuchen von Hong et al. mit dem von ihnen entwickelten channelled-balloon Katheter stießen auch sie auf Schwierigkeiten. Sie versuchten die Neointimabildung nach einer Ballonangioplastie im Kaninchen durch die lokale Applikation des ACE-Hemmers Enoxaparin zu hemmen. Dabei war es ihnen zwar möglich, Enoxaparin intramural mit einer Retention von 24 Stunden nachzuweisen, aber die Applikationseffizienz lag bei lediglich 0,1 bis 0,2 %. Sie konnten auch keine signifikante Inhibition der Proliferation der VSMC feststellen. Als Gründe für die geringe Applikationseffizienz und die fehlende Proliferationshemmung werden angeführt, dass das Enoxaparin sehr klein ist und keine entsprechenden Rezeptoren in der Media besitzt. Dadurch wird die lokale Retention verkürzt und

ein lokaler Effekt wird limitiert. Die intramurale Medikamentenmenge ist ebenfalls gering, denn der Großteil der applizierten Substanz gelangt in die systemische Zirkulation (65).

Für unsere Studie kann keine klare Aussage darüber getroffen werden, weshalb ein inhibitorischer Effekt der NF- κ B Oligonukleotide auf die Intimahyperplasie *in vivo* ausblieb. Es mag durchaus sein, dass eine mögliche positive Wirkung der Gentherapie durch den Einsatz des channeled-balloon Katheters und dem daraus resultierenden Barotrauma bzw. einer niedrigen Applikationseffizienz zunichte gemacht wurde. Die *ex vivo*-Vorversuche belegen zwar, dass die intramurale Platzierung unter den genannten Bedingungen möglich ist, aber über die Applikationseffizienz können keine Angaben gemacht werden. Es kann auch *in vivo* die intramurale Menge der Oligonukleotide nicht beurteilt werden.

4.4 Schlussfolgerung

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* durchaus möglich ist, die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen durch die Applikation von NF- κ B decoy-Oligonukleotiden zu hemmen. Die Ergebnisse der *in vitro*-Vorversuche ließen sich jedoch *in vivo* nicht bestätigen. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Restenose zwischen den mit decoy- und den mit scrambled-Oligonukleotiden behandelten Gefäßen festgestellt werden. Auch die Verwendung des channeled-balloon Katheters erwies sich *ex vivo* hinsichtlich einer Transfektion der Zielzellen als erfolgreich. *In vivo* konnten jedoch aufgrund des Versuchsaufbaus keine Aussagen über die Wirksamkeit der lokalen Pharmakotherapie getroffen werden.

Die Ergebnisse anderer Versuchsgruppen bestätigen die Beteiligung von NF- κ B am Restenosemechanismus und lassen zudem auch die decoy-Strategie als sinnvollen Therapieansatz erscheinen. Jedoch war die Inhibition der Restenose in diesem Tiermodell unter den genannten Therapiebedingungen nicht möglich. Es gilt, mögliche Fehlerquellen wie zum Beispiel Tiermodelle, Vektorsysteme und Applikationssysteme zur lokalen Pharmakotherapie zu optimieren.

5. Zusammenfassung

Die hohen Restenoseraten von 30-50% limitieren den Erfolg von zunächst erfolgreich durchgeführten Ballonangioplastien. Dabei spielt die übermäßig starke Proliferation der in der Gefäßwand befindlichen vaskulären glatten Muskelzellen und die daraus folgende Hyperplasie der Intima die Hauptrolle bei der Pathogenese der Restenose. Zahlreiche Studien haben die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an diesem komplexen Pathomechanismus nachgewiesen. Ergebnisse von Studien in Zellkulturen und tierexperimentelle Studien zeigten, dass durch die Hemmung der NF- κ B Aktivität die Neointimabildung reduziert werden kann.

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollte untersucht werden, ob durch die sequenzspezifische Blockade des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit decoy-Oligonukleotiden die Hyperplasie der Neointima nach einer Ballonangioplastie gehemmt werden kann. Die Applikation der Oligonukleotide erfolgte dabei lokal unter Verwendung eines channeled-balloon Katheters.

In den *in vitro*-Vorversuchen wurde zunächst untersucht, ob man durch die Transfektion von vaskulären glatten Muskelzellen mit NF- κ B-decoy-Oligonukleotiden mit Hilfe des Vektors Tfx-50 eine Proliferationshemmung erzielen kann. Dafür wurde zu einer Zellkultur aus je 8000 VSMC von Kaninchen ein Transfektionsreagenz aus 100 ng scrambled- bzw. decoy-ODN und 60 μ l Tfx-50 gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde gemessen, inwiefern eine Proliferation der Zellen unter den jeweiligen Bedingungen stattgefunden hat.

Die Hauptversuche wurden an 28 Weißen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Zur Stenoseinduktion erfolgte im Bereich der A. iliaca externa eine Ballonangioplastie mit Intimadenudation. Gleichzeitig erhielten die Versuchstiere über neun Wochen, beginnend eine Woche vor der ersten Operation, eine 1%ige Cholesterinkost. Sechs Wochen nach der Intimadenudation wurden in der zweiten Operation lokal die Oligonukleotide appliziert. Das Transfektionsreagenz setzte sich aus 60 μ l Tfx-50 und 1 μ g ODN in der Versuchsgruppe 1 bzw. 10 μ g ODN in der Versuchsgruppe 2 zusammen und wurde zu einem Gesamtvolumen von 2 ml mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt. Die lokale Pharmakotherapie mit den decoy-ODN erfolgte über den channeled-balloon Katheter bei 2 atm auf der einen Seite der A. iliaca externa, jeweils kontralateral erfolgte die Applikation der scrambled-ODN. Für die

Ballonangioplastie wurde ein Druck von 8 atm aufgewendet. Zur Auswertung der Präparate wurden die Versuchstiere vier Wochen nach der lokalen Intervention abgetötet. Morphometrisch wurden die Lumenfläche und die Neointimafläche bestimmt und das Intima/Media-Verhältnis berechnet.

In den *in vitro*-Vorversuchen konnte eine sequenz-spezifische Hemmung der Proliferation der VSMC *in vitro* nachgewiesen werden. In der Gruppe, in der die Zellen mit NF- κ B und Tfx-50 transfiziert worden waren, war die gemessene Zellmenge mit 49% verglichen mit der Kontrollgruppe, zu der keinerlei Reagenz hinzugefügt worden war, statistisch signifikant reduziert.

Durch die *ex vivo*-Vorversuche wurde bestätigt, dass durch den channeled-balloon Katheter eine effiziente Applikation und die Transfektion der Zielzellen mit dem Transfektionsreagenz möglich ist.

Bei den *in vivo*-Versuchen konnte hinsichtlich der Intimafläche zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei der Versuchsgruppe 1, die mit 1 μ g decoy-ODN behandelt worden war, betrug die Intimafläche $0,974 \pm 0,943 \text{ mm}^2$. Die Kontrollseite zur Versuchsgruppe 1 wies eine Neointima von $0,979 \pm 0,908 \text{ mm}^2$ auf. In der Versuchsgruppe 2 zeigten die mit 10 μ g decoyODN behandelten Gefäße eine Neointimafläche von $0,973 \pm 0,776 \text{ mm}^2$. Die Kontrollseite wies $1,033 \pm 0,804 \text{ mm}^2$ auf.

Auch der Vergleich der Lumenflächen und des Intima/Media-Verhältnisses der Versuchsgruppen erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Vorversuche ließen sich *in vivo* nicht bestätigen. Unter den genannten Bedingungen ließ sich *in vivo* kein inhibitorischer Effekt einer Therapie mit NF- κ B decoy-ODN auf die Neointimabildung erkennen. Die lokalen Applikationsmodalitäten müssen weiter verbessert werden, um möglichst hohe Transfektionsraten zu gewährleisten.

6. Literaturverzeichnis

1. Alfke H, Wagner HJ, Calmer C, Klose KJ
Local intravascular drug delivery: In vitro comparison of three catheter systems
Cardiovasc Intervent Radiol 1998; 21: 50-56
2. Antischkow N
Über die Atherosklerose der Aorta beim Kaninchen und über deren Entstehungsbedingungen.
Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie 1914; 59: 308-348
3. Armeanu S, Pelisek J, Krausz E, Fuchs A, Groth D, Curth R, Keil O, Quilici J, Rolland PH, Reszka R, Nikol S
Optimization of nonviral gene transfer of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo
Molecular Therapy 2000; 1; 4: 366-375
4. Aupperle KR et al.
NF- κ B regulation by I- κ B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes
J Immunol 1999; 163: 427-433
5. Autieri MV, Yue TL, Ferstein GZ, Ohlstein E
Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B inhibit human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries
Biochem Biophys Res Comm 1995; 213; 3: 827-836
6. Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Meyer B, Mailhac A, Fallon JT, Falk E, Badimon L, Fuster V, Chesebro JH
Different response to balloon angioplasty of carotid and coronary arteries: effects of acute platelet disposition and intimal thickening
Atherosclerosis 1998; 140: 307-314
7. Bailey SR
Mechanisms of delivery and local drug delivery technology
Semin Intervent Cardiol 1996; 1: 17-23
8. Bailey SR
Local drug delivery: Current applications
Progr Cardiovasc Dis 1997; 40: 183-204
9. Baldwin AS
NF- κ B in defense and disease. The transcription factor NF- κ B and human disease
J Clin Inv 2001; 107; No. 1: 3-6

10. Bao S, Thrall BD, Miller DL
Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro
Ultrasound in Medicine and Biology 1997; 23; 6: 953-959
11. Batchelor WB, Robinson R, Strauss BH
The extracellular matrix in balloon arterial injury: a novel target for restenosis prevention
Progr Cardiovasc Dis 1998; 41; 1:35-49
12. Baumgartner HR
The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi
Microvasc Res 1973; 5: 167-179
13. Bauters C, Isner JM
The biology of restenosis
Progr Cardiovasc Diseases 1997; 40; 2: 107-116
14. Berger PB, Holmes DR, Ohman EM, O'Hanesian MA, Murphy JG, Schwartz RS, Serruys PW, Faxon DP
Restenosis, reocclusion and adverse cardiovascular events after successful balloon angioplasty of occluded versus nonoccluded coronary arteries
Results from the multicenter American research trial with Cilazapril after angioplasty to prevent transluminal coronary obstruction and restenosis (MARCATOR)
J Am Coll Cardiol 1996; 27: 1-7
15. Borgatt M, Breda L, Cortesi R, Nastruzzi C, Romanelli A, Saviano M, Bianchi N, Mischiati C, Pedone C, Gambari R
Cationic liposomes as delivery systems for double-stranded PNA-DNA exhibiting decoy activity against NF- κ B transcription factors
Biochem Pharmacol 2002; 64: 609-616
16. Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H, Kadl A, Baumgartl G, Steurer S, Xu Z, Koshelnick Y, Lipp J, DeMartin R, Losert U, Lammer J, Binder BR
Activation of nuclear factor- κ B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model
Circulation 2002; 105: 633
17. Brieger D, Topol E
Local drug delivery systems and prevention of restenosis
Cardiovascular Research 1997; 35; 405-413

18. Bult H
Restenosis: a challenge for pharmacology. Review
TiPS; July 2000; 21: 274-279
19. Bundesverband niedergelassener Kardiologen
20. Cejna M, Breuss JM, Bergmeister H, de Martin R, Xu Z, Grgurin M, Losert U, Plenck H, Binder BR, Lammer J
Inhibition of neointimal formation after stent placement with adenovirus-mediated gene transfer of I κ B α in the hypercholesterolemic rabbit model: initial results
Radiology; 2002; 223: 702-708
21. Cercek B, Yamashita M, Dimayuga P, Zhu J, Fishbein MC, Kaul S, Shah PK, Nilsson J, Regnstrom J
Nuclear factor- κ B activity and arterial response to balloon injury
Atherosclerosis 1997; 131: 59-66
22. Classen M, Diehl V, Kochsiek K
Innere Medizin
4. Auflage (1998); Urban & Schwarzenberg
23. Clowes AW, Schwartz SM
Significance of quiescent smooth muscle cell migration in the injured rat carotid artery:
Circ Res 1985; 56: 139
24. Collins T, Cybulsky MI
NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis ?
J Clin Invest 2001; 107; 3: 255-264
25. Consigny PM, Miller KT
Drug delivery into the arterial wall: A time-course study with use of a lipophilic dye
J Vasc Intervent Radiol 1994; 5: 731-737
26. Currier JW, Faxon DP
Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: Have we been aiming the wrong target ?
J Am Coll Cardiol 1995; 24: 516-520
27. Daemon MJAP, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM
Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall
Circ Res 1991; 68: 451-456

28. Dangas G, Fuster V
Management of restenosis after coronary intervention
Am Heart J 1996; 132: 428-436
29. Darius H, Buerke M, Boissel JP, Grosser T, Veit K, Zarachowski K, Meyer J
Lokale Medikamentengabe und Gentherapie
Herz 1997; 22:347-354
30. Dotter CT, Judkins MP
Transluminal treatment of atherosclerotic obstruction. Description of a new technic and a preliminary report of its application
Circulation 1964; 30: 654-70
31. Edelman ER, Adams DH, Karnovsky MJ
Effect of controlled adventitial heparin delivery on smooth muscle cell proliferation following endothelial injury
Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 3773-3777
32. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ et al.
Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans
Circulation 1999; 99: 44-52
33. Faxon DP, Spiro TE, Minor S, Cote G, Douglas J, Gottlieb R, Califf R, Dorosti K, Topol E, Gordon JB et al.
Low molecular weight heparin in prevention of restenosis after angioplasty. Results of Enoxaparin Restenosis (ERA) Trial
Circulation 1994; 90: 908-14
34. Faxon DP
Effect if high dose Angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis: Final results of the MARCATOR study, a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of Cilazapril
J Am Coll Cardiol 1995; 2: 362-369
35. Faxon DP, Coats W, Currier J
Remodeling of the coronary artery after vascular injury
Progr Cardiovasc Dis 1997; 40; 2: 129-140
36. Fernandez-Ortiz A, Meyer BJ, Mailhac A, Falk E, Badimon L, Fallon JT, Fuster V, Chesebro JH, Badimon JJ
A new approach for local intravascular drug delivery. Iontophoretic Balloon
Circulation 1994; 89: 1518-1522

37. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M et al.
A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators
N Engl J Med 1994; 331: 496-501
38. Flavahan NA
Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction: potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity
Circulation 1992; 85: 1927-1938
39. Foley DP, Melkert R, Umans VA, de Jaegere PP, Strikwerda S, de Feyter PJ, Serruys PW
Differences in restenosis propensity of devices for transluminal coronary intervention. A quantitative angiographic comparison of balloon angioplasty, directional atherectomy, stent implantation and excimer laser angioplasty. CARPORT, MERCATOR, MARCATOR, PARK, and BENESTENT Trial Groups
Eur Heart J 1995;16; 10: 1331-1346
40. Fram DB, Aretz TA, Mitchel J et al.
Localized intramural delivery of a marker agent during balloon angioplasty: a new technique using hydrogel coated balloons and active diffusion
Circulation 1992; 86; 1: 1-380
41. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH
Mechanism of disease. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. First of two parts
N Engl J Med 1992; 326; 4: 242-250
42. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH
Mechanism of disease. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. Second of two parts
N Engl J Med 1992; 326; 5: 310-318
43. Gertz SD, Gimple LW, Banai S, Ragosta M, Powers ER, Roberts WC, Perez LS, Sarembock IJ
Geometric remodeling is not the principal pathogenetic process in restenosis after balloon angioplasty
Circulation 1994; 90: 3001-3008
44. Ghosh S, May MJ, Kopp EB
NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses
Annu Rev Immunol 1998;16: 225-260

45. Gimple LW, Gertz SD, Haber HL, Ragosta M, Powers ER, Roberts WC, Sarembock IJ
Effect of chronic subcutaneous or intramural administration of heparin on femoral artery restenosis after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits
Circulation 1992; 86: 1536-1546
46. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al.
Differential enlargement of artery segments in response to enlarging atherosclerotic plaques
N Engl J Med 1987; 316: 1371-1375
47. Gonschior P, Goetz AE, Huehns TY, et al.
A new catheter for prolonged local drug delivery
Coronary Art Dis 1995; 6: 329-334
48. Gonschior P, Wilensky R, March K, Höfling B
Lokale Medikamentenapplikationssysteme, präklinische und klinische Anwendung: Perspektiven und Limitationen
Z Kardiol 1996; 85: 155-165
49. Gradus-Pizlo I, Wilensky RL, March KL, et al.
Local delivery of biodegradable microparticles containing colchicine analog: Effects on restenosis and implications for catheter based drug delivery
J Am Coll Cardiol 1995; 26: 6: 1549-1557
50. Grimm S, Baeuerle PA
The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of its protein subunits
Biochem J 1993; 290: 297-308
51. Gross DR
Thromboembolic phenomena and the use of the pig as an appropriate animal model for research on cardiovascular devices
J Artificial Organs 1997; 20: 195-203
52. Haarer SL, Emig LL, Keiser JA
Vascular remodeling in balloon injured rabbit iliac arteries
Basic Res Cardiol 1998; 93; 2: 108-115
53. Hamon M, Lecluse E, Monassier JP, Grollier G, Potier JC
Pharmacological approaches to the prevention of restenosis after coronary angioplasty
Drugs & Aging 1998; 13; 4: 291-301

54. Han ZN, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS
AP-1 and NF- κ B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis
Autoimmunity 1998; 28: 197-208
55. Hansson GK, Libby P
The role of the lymphocyte, in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds)
Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. Lippincott-Raven; Philadelphia, PA 1996: 557-569
56. Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF
Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappa B in asthma
Am J Respir Crit Care Med 1998; 158: 1585-1592
57. Hehrlein C, Stintz M, Kinscherf R, Schlosser K, Huttel E, Friedrich L, Fehsenfeld P, Kubler W
Pure beta-particle-emitting stents inhibit neointima formation in rabbits
Circulation 1996; 93: 641-5
58. Hellgren I, Drvota V, Pieper R, Enoksson S, Blomberg P, Islam KB, Sylven C
Highly efficient cell-mediated gene transfer using non-viral vectors and FuGene-6: in vitro and in vivo studies
Cellular and Molecular Life Sciences 2000; 57: 1326-1333
59. Henry SP, Bolte H, Auletta C, Kornbrust DJ
Evaluation of the toxicity of ISIS 2302, a phosphorothioate oligonucleotide, in a four-week study in cynomolgus monkeys
Toxicology 1997; 120: 145-155
60. Hiscott J, Kwon H, Génin P
NF- κ B in defense and disease. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway
J Clin Inv 2001; 107; 2: 143-151
61. Höfling B, Gonschior P, Nikol S, Bauriedel G, Welsch U, Nerlich A
Pathophysiologie und Pathobiochemie der Rezidivstenose. Übersicht
Z Kardiol 1994; 83: 313-318
62. Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Höher M
Rezidivstenose nach Koronarangioplastie. Klinische, zellbiologische und molekulare Aspekte
Z Kardiol 1995; 84: 5-21

63. Hong MK, Wong SC, Farb A, Mehlmann MD, Virmani R, Barry JJ, Leon MB.
Feasibility and drug delivery efficiency of a new balloon angioplasty catheter capable of performing simultaneous local drug delivery
Coronary Artery Disease 1993; 4: 1023-1027
64. Hong MK, Wong SC, Farb A, Mehlman MD, Virmani R, Barry JJ, Leon MB
Localized drug delivery in atherosclerotic arteries via a new balloon angioplasty catheter with intramural channels for simultaneous local drug delivery
Catheterization and Cardiovasc Diagn 1995; 34: 263-270
65. Hong MK, Wong SC, Barry JJ, Bramwell O, Tjurmin A, Leon MB
Feasibility and efficacy of locally delivered enoxaparin via the channeled-balloon catheter on smooth muscle cell proliferation following balloon injury in rabbits
Cath Cardiovasc Diagn 1997; 41: 241-245
66. Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y, Kano S
Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner
American Journal of Physiology 1991; 260: H1713-H1717
67. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH
Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation
J Am Coll Cardiol 1990; 15: 1667-87
68. Isner JM
Vascular remodelling: Honey, I think I shrunk the artery
Circulation 1994; 89; 6:2937-2941
69. Isner JM
Oligonucleotide therapeutics-novel cardiovascular targets
Nat Med 1997; 3: 834-835
70. Jackson CL
Animal models of restenosis
Trends Cardiovasc Med 1994; 4: 122-130

71. Johnson JG, Griggs TR, Badimon L
The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations
Thromb Haemost 1999; 81: 835-43
72. Jorgenson B, Tonnesen KH, Bulow J, et al.
Femoral artery recanalization with percutaneous angioplasty and segmentally enclosed plasminogen activator
Lancet 1989; 1: 1106-1108
73. Kalinowski M, Alfke H, Bergen S, Klose KJ, Barry JJ, Wagner HJ
Comparative trial of local pharmacotherapy with L-Arginine, r-Hirudin, and Molsidomine to reduce restenosis after balloon angioplasty of stenotic rabbit iliac arteries
Radiology 2001; 219; 3: 716-723
74. Kalinowski M, Alfke H, Hamann C, Viehofer K, Klose KJ, Barry JJ, Wagner HJ
Effects of altering infusion parameters on intimal hyperplasia following local catheter-based delivery into the rabbit iliac artery
Atherosclerosis 2004; 172; 1: 71-78
75. Kandarpa K, Nakatsuka S, Yousuf N, Barry JJ
Site-specific delivery of iloprost during experimental angioplasty suppresses smooth muscle cell proliferation
J Vasc Interv Radiol 1998; 9: 487-492
76. Karim MA
In vivo role of the extracellular matrix during vascular repair
Basic Res Cardiol 1998; 93; Suppl. 4, 50-54
77. Karsch KR
Atherosclerosis – Where are we heading?
Herz 1992; 17: 309-319
78. Kearney M, Pieczek A, Haley L, Losordo DW, Andres V, Schainfeld R, Rosenfield K, Isner JM
Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease.
Circulation 1997; 95: 1998-2002
79. Khaled Z, Benimetskaya L, Zeltser R, Khan T, Sharma HW, Narayanan R, et al.
Multiple mechanisms may contribute to the cellular anti-adhesive effects of phosphorothioate oligonucleotides
Nucl Acids Res 1996; 24: 737-745

80. Kimura T, Miyauchi K, Yamagami S, Daida H, Yamaguchi H
Local delivery infusion pressure is a key determinant of vascular damage and intimal thickening
Jpn Circ J 1998; 62: 299-304
81. Kranzhöfer R, Libby P
Interrelation between atherosclerosis and restenosis
Z Kardiol 1995; 84; Suppl. 4: 125-128
82. Laird JR, Carter AJ, Kufs WM, Hoopes TG, Farb A, Nott SH, Fischell RE, Fischell DR, Virmani R, Fischell TA
Inhibition of neointimal proliferation with low-dose irradiation from a beta-particle-emitting stent
Circulation 1996; 93: 529-36
83. Lawrie A, Briskin AF, Francis SE, Tayler DI, Chamberlain J, Crossman DC, Cumberland DC, Newman CM
Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro
Circulation 1999; 99: 2617-2620
84. Lefkovits J, Topol EJ
Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention
Progr Cardiovasc Dis 1997; 40; 2: 141-158
85. Li C, Xu Q
Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells
Cellular signalling 2000; 12:435-445
86. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK
A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression
Circulation 1992; 86; Suppl. III: III-47-III-52
87. Libby P, Tanaka H
The molecular bases of restenosis
Progr Cardiovasc Dis 1997; 40; No. 2: 97-106
88. Lindner V
The NF- κ B and I κ B system in injured arteries.
Pathobiology 1998; 66: 311-320
89. Löffler G, Petrides PE
Biochemie und Pathobiochemie
6. Auflage (1998); Springer-Verlag

90. Löqvist A, Emanuelsson H, Nilsson J, Lundqvist H, Carlsson J
Pathophysiological mechanisms for restenosis following coronary angioplasty: possible preventive alternatives
Journal of Internal Medicine 1993; 233:215-226
91. Loppnow H, Libby P (in Ref. 2)
Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6
Journal of Clinical Investigations
92. Mann MJ, Gibbons GH, Kernoff RS, Diet FP, Tsao PS, Cooke JP, et al.
Genetic engineering of vein graft resistant to atherosclerosis
Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 4502-4506
93. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF et al.
Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: The PREVENT single-centre, randomised controlled trial
Lancet 1999; 354: 1493-1498
94. Mann MJ
Gene therapy for peripheral arterial disease
Molecular medicine today 2000;6:285-291
95. March KL
Methods of local gene delivery to vascular tissues
Semin Intervent Cardiol 1996; 1:215-223
96. The multicenter European research trial with Cilazapril after angioplasty to prevent transluminal coronary obstruction and restenosis (MERCATOR) study group
Does the new Angiotensin-converting enzyme inhibitor Cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty?
Circulation 1992; 86: 100-110
97. Miura S, Tachibana K, Okamoto T, Saku K
In vitro transfer of antisense oligodeoxynucleotides into coronary endothelial cells by ultrasound
Biochemical and Biophysical Research Communications 2002; 298: 587-590
98. Moreno PR, Palacios IF, Leon MN, Rhodes J, Fuster V, Fallon JT
Histopathologic comparison of human coronary in-stent and post-balloon angioplasty restenotic tissue
Am J Cardiol 1999; 84: 462-466, A9

99. Morice MC, Serruys PW, J Sousa, JE, Fajadet J, Hayashi EB, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnár F, Falotico R for the RAVEL Study Group
A Randomized Comparison of a Sirolimus-Eluting Stent with a Standard Stent for Coronary Revascularization
New England Journal of Medicine 2002; 346; 23: 1773-1780
100. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, et al.
Single intraluminal delivery of antisense cdc 2 kinase and PCNA oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia
Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 8474-8479
101. Morishita R, Gibbons GH, Horiuchi M, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, et al.
A novel molecular strategy using cis element “decoy” of E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo
Proc Natl Acad Sci. USA 1995; 92: 5855-5859
102. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T
In vivo transfection of cis element “decoy” against nuclear factor- κ B binding site prevents myocardial infarction
Nature Medicine 1997; 3; 8: 894-899
103. Morishita R, Nakagami H, Taniyama Y, Matsushita H, Yamamoto K, Tomita N, Moriguchi A, Matsumoto K, Higaki J, Ogihara T
Oligonucleotide-based gene therapy for cardiovascular disease
Clin Chem Lab Med 1998; 36; 8: 529-534
104. Morishita R
Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease
Circulation Journal 2002; 66: 1077-1086
105. Nakajima T, Kitajima I, Shin H, Takasaki I, Shigeta K, Abeyama K, Yamashita Y, Tokioka T, Soejima Y, Maruyama I
Involvement of NF- κ B activation in Thrombin-induced human vascular smooth muscle cell proliferation
Biochemical and Biophysical Research Communications 1994; 204; 2: 950-955
106. Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K
Animal models for atherosclerosis, restenosis and endovascular graft research
J Vasc Interv Radiol 2000; 11: 5-17

107. Neurath MF et al.
Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease
Ann NY Acad Sci 1998; 859: 149-159
108. Nikol S, Huehns TY, Höfling B
Molecular biology and post-angioplasty restenosis. Review
Atherosclerosis 1996; 123: 17-31
109. Obata H, Biro S, Arima N, Kaieda H, Kihara T, Eto H, Miyata M, Tanaka H
NF-κB is induced in the nuclei of cultured rat aortic smooth muscle cells by stimulation of various growth factors
Biochemical and Biophysical Research Communications 1996; 224: 27-32
110. Parkes R, Meng QH, Siapati KE, McEwan JR, Hart SL
High efficiency transfection of porcine vascular cells in vitro with a synthetic vector system
J Gene Med 2002; 4: 292-299
111. Pelisek J, Engelmann MG, Golda A, Fuchs A, Armeanu S, Shimizu M, Mekkaoui C, Rolland PH, Nikol S
Optimization of nonviral transfection: variables influencing liposome-mediated gene transfer in proliferating vs. quiescent cells in culture and in vivo using a porcine restenosis model
J Mol Med 2002; 80: 724-736
112. Phillips-Hughes J, Kandarpa K
Restenosis: Pathophysiology and preventive strategies
J Vasc Interv Radiol 1996; 7: 321-333
113. Powell JS, Clozel JP, Muller RKM et al.
Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury
Science 1989; 249: 186-188
114. Pratt RE, Dzau VJ
Pharmacological strategies to prevent restenosis: Lessons learned from blockade of the renin-angiotensin system
Circulation 1996; 93: 848-852
115. Riessen R, Isner JM
Prospects for site-specific delivery of pharmacologic and molecular therapies
J Am Coll Cardiol 1994; 23: 1234

116. Ross R
The pathogenesis of atherosclerosis: an update
New England Journal of Medicine 1986; 314:488-500
117. Ross R
Mechanism of disease. Atherosclerosis- an inflammatory disease
New England Journal of Medicine 1999; 340; 2: 115-126
118. Ruygrok PN, Muller DW, Serruys PW
Rapamycin in cardiovascular medicine
Intern Med J 2003; 33; 3: 103-9
119. Santoian EC, Gravanis MB, Schneider JE, Tarazona N, Cipolla GD, Robinson KA, et al.
Use of the porous balloon in porcine coronary arteries: Rationale for low pressure and volume delivery
Cathet Cardiovasc Diagn 1993; 30: 348-354
120. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K
Anatomie
7. Auflage (1997); Springer-Verlag
121. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR
Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in the porcine coronary arteries
Circulation 1990; 82: 2190-2200
122. Schwartz RS, Holmes DR
Pigs, dogs, baboons, and man: lessons for stenting from animal models
J Intervent Cardiol 1994; 7: 355-368
123. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR
Artery size, neointima and remodeling. Time for some standards
J Am Coll Cardiol 1998; 32: 2087-2094
124. Sen R, Baltimore D
Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism
Cell; 1986; 47: 921-928
125. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P et al.
A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group
N Engl J Med 1994; 331: 489-95

126. Shaw LA, Rudin M, Cook NS
Pharmacological inhibition of restenosis: learning from experience
TiPS 1995; 16: 401-404
127. Simons M, Edelman ER, DeKeyser J-L, Langer R, Rosenberg RD
Antisense c-myb oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo
Nature 1992; 359: 67-80
128. Smith RC, Walsh K
Local gene delivery to the vessel wall
Acta Physiologica Scandinavica 2001; 173; 1: 93-102
129. Sousa JE, Costa MA, Sousa AG, Abizaid AC, Seixas AC, Abizaid AS, Feres F, Mattos LA, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW
Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries
Circulation. 2003; 107;:3: 381-3
130. Spiecker M, Darius H, Liao JK
A functional role of I- κ B-epsilon in endothelial cell activation
J Immunol 2000; 164: 3316-3322
131. Sary HC
Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults.
Arteriosclerosis 1989; 99; Suppl 1: I-19-I-32
132. Statistisches Bundesamt
133. Steinberg D
Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment
Circulation 1991; 84: 1420-1425
134. Tak PP, Firestein GS
NF- κ B in defense and disease. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases
J Clin Inv 2001; 107; 1: 7-11
135. Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Namba T, Yamasaki K, Hashiya N, Aoki M, Ogihara T, Yasufumi K, Morishita R
Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound
Circulation 2002; 105; 10: 1233-1239
136. Teiger E, Deprez I, Dupouy P, Sitbon M, Adnot S, Dubois-Rande JL
Local gene delivery within the media of rabbit iliac arteries by using the infiltrator intramural delivery device
J Cardiovasc Pharmacology 1999; 33; 5: 726-732

137. Thierry J, Teupser D
Genetische Faktoren der Atheroskleroseentstehung
Z Kardiol 1998; 87: 777-787
138. Thomas JW, Kuo MD, Chawla M, Waugh JM, Yuksel E, Wright KC, Gerrity PM, Shenaq SM, Whigham CJ, Fisher RG
Vascular gene therapy
Radiographics 1998; 18: 1373-1394
139. Topol EJ
Coronary-artery stents – gauging, gorging and gouging
N Engl J Med 1998; 339: 1702-1704
140. Uchida E, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Hayakawa T
Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells
Biol. Pharm. Bull 2002; 25; 7: 891-897
141. Vesselinovitch D
Animal models and the study of atherosclerosis
Arch Pathol Lab Med 1988; 112: 1011-1017
142. Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH
An I κ B- α mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells
J Surg Res 2002; 102: 198-206
143. Weintraub WS, Boccuzzi SJ, Klein JL, Kosinski AS, King SB 3rd, Ivanhoe R, Cedarholm JC, Stillabower ME, Talley JD, DeMaio SJ et al.
Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. Lovastatin Restenosis Trial Study Group
N Engl J Med 1994; 331: 1331-1337
144. Welt F, Rogers C
Inflammation and restenosis in the stent era
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2002; 22; 11: 1769-1776
145. Westedt U, Barbu- Tudoran L, Schaper AK, Kalinowski M, Alfke H, Kissel T
Deposition of Nanoparticles in the Arterial Vessel by Porous Balloon Catheters: Localization by Confocal Laser Scanning Microscopy and Transmission Electron Microscopy
AAPS Pharm Sci 2002; 4; 41

146. Wikiel WC
Restenosis after balloon angioplasty and/or stent insertion- origin and prevention
Acta Radiologica; 2002; 43; 5: 442-446
147. Wilensky RL, March KL, Gradus-Pizlo I, Sandusky G, Fineberg N, Hathaway D
Vascular injury, repair and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit
Circulation 1995; 92: 2995-3005
148. Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, Yamamoto K, Nakagami H, Kaneda Y, Sakai N, Ogiwara T
Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor-kappa B binding site as a novel molecular strategy
Gene Ther 2001; 8; 21: 1635-42
149. Zhang G, Ghosh S
Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity
J Clin Invest Jan 2001; 107:13-19

7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. K.J. Klose, Leiter der Abteilung für Strahlendiagnostik des Medizinischen Zentrums für Radiologie der Philipps-Universität Marburg, für die Möglichkeit der Promotion.

Für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Durchführung und der Auswertung der Arbeit möchte ich mich bei Herrn PD Dr. H. Alfke und bei Herrn Dr. M. Kalinowski bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau B. Kleb und Dr. F. Nocken für die Durchführung der Vorversuche. Frau Kleb danke ich zudem für die Herstellung der ODN-Lösungen und die Färbung der Gefäßpräparate.

Frau Dr. Pankoweit vom Zentrum für Innere Medizin/Kardiologie danke ich für die freundliche Überlassung der Digitalkamera zur Auswertung der Präparate.

Bei Frau Fischer vom Institut für Pathologie möchte ich mich für die Einbettung der Gefäßpräparate bedanken.

Für ihre Unterstützung danke ich auch allen Mitarbeitern der Abteilung für Strahlendiagnostik, insbesondere Frau B. Trampe.

Danken möchte ich auch Herrn Reich für die Betreuung und Versorgung der Versuchstiere.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Rostock:

Brock, Dörfling, Gerber, Jonas, Krüger, Meyer-Probst, Müller, Noack, Pfeiffer, Richter, Roether, Ulfig, Vogel, Wree

In Marburg:

Alfke, Arnold, Aumüller, Barth, Baum, Berger, Bertalanffy, Bien, Christiansen, Czubayko, Engenhardt-Cabilic, Göke, Görg, Gotzen, Griss, Gudermann, Hadji, Happel, Hellinger, Hellwig, Herzum, Hofmann, Joseph, Jungclas, Klaus, Klenk, Klose, König, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Kuni, Lennartz, Lippert, Lorenz, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pfeiffer, Remschmidt, Renz, Richter, Rominger, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schäfer J, Schäfer M, Schmidt, Schnabel, Schüffel, Sekundo, Seyberth, Sommer, Stief, Stiletto, Vogelmeier, Vohland, Wagner H-J, Wagner U, Werner, v. Wichert, Wulf, Zielke

In Lahr:

Billmann, Dürr, Fleischmann, Fösel, Göppinger, Mangold, Mauser, Schmelzeisen, Schuchardt, Wehner